



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE LIMONENO EM α E β -
CICLODEXTRINA

POLLIANA BARBOSA PEREIRA DOS SANTOS

São Cristóvão

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE LIMONENO EM α E β -
CICLODEXTRINA

POLLIANA BARBOSA PEREIRA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

São Cristóvão

2014

POLLIANA BARBOSA PEREIRA DOS SANTOS

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE LIMONENO EM α E β -
CICLODEXTRINA

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Gerson Antônio Pianetti

2º Examinador: Francilene Amaral da Silva

PARECER

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Santos, Polliana Barbosa Pereira dos

S237p Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão de limoneno em α e β -ciclodextrina / Polliana Barbosa Pereira dos Santos; orientador Adriano Antunes de Souza Araújo. – São Cristóvão, 2014.

123 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Farmacologia. 2. Físico-Química. 3. Monoterpeno. 4. Essências e óleos essenciais. I. Araújo, Adriano Antunes de Souza, orient. II. Título.

CDU 615.011

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao tamanho original.*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

À todos aqueles que acreditaram
no meu potencial e que nos
momentos mais difíceis me
ajudaram de maneira
extraordinária.

AGRADECIMENTOS

É indispensável agradecer por todos aqueles que acreditaram em mim e foram o meu guindaste nos momentos mais difíceis no decorrer da minha caminhada.

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me permitir realizar mais um sonho, por me dar força e coragem nos momentos difíceis e por ter me dado o presente maravilhoso de ser mãe.

Agradeço aos meus Pais, Paulo e Fátima, por ter acreditado em meu potencial e investiram na minha formação profissional e por nunca terem deixado de acreditar em mim, AMO MUITO VOCÊS.

Agradeço também as minhas irmãs, Luçara e Beatriz, que mesmo em meio a tantas brigas e brincadeiras nunca deixaram de me ajudar.

Agradeço ao meu filho Dillan, que ao pensar que não ia dar certo no dia da inscrição ele me disse “mamãe você vai tussigui”, VOCÊ É O MEU PRESENTE, minha força em momentos de fraqueza e angústia, minha felicidade quando estamos juntos independente do lugar ou estação do ano, TE AMO MUITO.

Agradeço ao meu querido Professor e Mestre Adriano Antunes, que desde o primeiro contato que tivemos no primeiro período do Curso de Farmácia nunca deixou de me ajudar, pela paciência e por acreditar em mim e pelo incentivo na realização deste sonho.

Agradeço aos Professores: Francilene, Divaldo, Wellington, Rogéria, Aurélia, Lucindo, Ana Amélia, Vitor, Cláudio, pela ajuda e apoio, por cederem um minuto dos seus preciosos tempo para me ajudar.

Agradecimento especial aos amigos do LEFT, Carla, Kérilin, Bruno Santana, Bruno Lima, Carlos Adriano, Grace, Mairim, Paula Menezes, Yohanna, Daviane, Aldino, Alessandra Rabelo e Igor pela amizade e pela preciosa ajuda de vocês.

Agradeço a Adriana e Luciana Figueiredo, pela amizade e pelo enorme apoio e incentivo desde o dia em que nos conhecemos.

Agradecimento especial para o Prof. Dr Daniel da Fiocruz, pela grandiosa ajuda, paciência e atenção. Assim como para a Lúcia e o Cláudio, pela ajuda na realização dos experimentos.

Agradeço imensamente por ter essas amizades e apoio que Deus me abençoou em conhecer e por acreditarem em mim e pelas orações, Raimunda, Jairo, Filipe, Silvia, Maria, Cristiane, Carol, Délio, Leandro, Daniela, Louise, Jeferson, Adla, Fernando, Juliene, Sherina.

Agradeço ao Pastor Washington, Pastor Davi e o Pastor Joaz, pelas orações e pelo grande apoio.

À FAPITEC pelo financiamento, através da bolsa concedida para realização do Mestrado.

A todos que fazem parte do NPGCF e do DFA, pelos anos de convivência e companheirismo.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	5
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 <i>Terpenos</i>	7
3.2 <i>Limoneno</i>	9
3.3 <i>Ciclodextrina</i>	12
3.4 <i>Complexo de Inclusão</i>	16
3.5 <i>α-Ciclodextrina</i>	19
3.6 <i>β-Ciclodextrina</i>	21
3.7 <i>Métodos de Formação de Complexo</i>	24
3.8 <i>Técnicas Utilizadas na Caracterização dos Complexos de Inclusão</i>	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 <i>Materiais</i>	33
4.2 <i>Métodos</i>	33
4.2.1 <i>Obtenção e preparação dos Complexos de Inclusão do Limoneno</i>	33
4.2.1.1 <i>Complexação por Mistura Física</i>	33
4.2.1.2 <i>Complexação por Malaxagem</i>	33

4.2.1.3 Complexação por Co-Evaporado.....	33
4.2.2 Caracterização Físico-Química dos Complexos de Inclusão com Limoneno.....	34
4.2.2.1. Extração do Limoneno Total dos Complexos de Inclusão.....	34
4.2.2.2 Extração do Limoneno adsorvido na superfície da Ciclodextrina.....	34
4.2.2.2 Análises.....	35
4.2.3 Térmica.....	35
4.2.3.1 Estudo cinético da primeira etapa de decomposição.....	35
4.2.3.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG/EM).....	35
4.2.3.3 Difração de raio-x (DRX).....	36
4.2.3.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	36
4.2.3.5 Modelagem Molecular (Docking).....	36
4.2.3.6 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV).....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Análise Térmica.....	39
5.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	44
5.3 Difração de Raio-X (DRX).....	48
5.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	49
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53
5.6 Modelagem Molecular (Docking).....	58
5.7 Estudo cinético da primeira etapa de perda de massa.....	59
6. CONCLUSÃO.....	69
7. PERSPECTIVAS.....	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9. TRABALHOS REALIZADOS.....	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD	Ciclodextrina
CE	Co-evaporado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas
CI	Complexo de inclusão
CIL	Complexo de inclusão com limoneno
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FTIR	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho
LIM	Limoneno
MA	Malaxagem
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
MM	Massa molecular
OE	Óleo essencial
TG/DTG	Termogravimetria/Termogravimetria derivada

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais dimensões das estruturas cônicas das ciclodextrinas.	15
Quadro 2	Solubilidade em água e porcentagem de água de hidratação para as ciclodextrinas naturais.	16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular plana do isopreno, unidade básica para formação de terpenóides.	7
Figura 2	Estruturas dos isômeros R e S limoneno, e suas respectivas nomenclaturas comercial e sistemática segundo a IUPAC.	10
Figura 3	Representação estrutural da A) D-glicopirranose e das B) ciclodextrinas. Fonte: SOUSA, 2010; ASTRAY et al, 2009. Figura adaptada pela autora.	13
Figura 4	A) Estrutura molecular da ciclodextrina, B) corte transversal de uma molécula de ciclodextrina que mostra a disposição de uma unidade de glicose e a C) representação cônica mostrando parte exterior hidrofílica e cavidade hidrofóbica. Fonte: SRINIVASAN et al, 2011. Figura adaptada pela autora.	15
Figura 5	Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão em meio aquoso. A molécula-hospedeira é o p-xileno e as moléculas de água estão representadas por círculos. Fonte: Adaptado pela autora de ASTRAY et al, 2009.	17
Figura 6	Curvas DSC do Limoneno (LIM), α -CD, MF, MA, CE obtidas em atmosfera dinâmica de N ₂ .	40
Figura 7	Curvas DSC do Limoneno (LIM), β -CD, MF, MA, CE obtidas em atmosfera dinâmica de N ₂ .	41
Figura 8	Curvas TG/DTG do Limoneno, α -CD (α -Ciclodextrina), MF (Mistura Física), MA (Malaxagem) e CE (Co-Evaporado) obtidas em atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹) e razão de aquecimento 10 °C.min ⁻¹ .	42
Figura 9	Curvas TG/DTG do Lim (Limoneno), β -CD (β -Ciclodextrina), MF (Mistura Física), MA (Malaxagem) e CE (Co-Evaporado) obtidas em atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹) e razão de aquecimento 10 °C.min ⁻¹ .	43
Figura 10	Cromatograma do óleo total das amostras obtidas por mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) para os complexos de α -CD com limoneno.	45
Figura 11	Cromatograma do óleo total das amostras obtidas por mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) para os complexos de β -CD com limoneno.	46
Figura 12	Difração de raios X da α -CD, mistura física (MF), malaxagem	48

(MA) e co-evaporação (CE).

Figura 13	Difração de Raios X da β -ciclodextrina (β -CD), mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE).	49
Figura 14	Os espectros de infravermelho de limoneno (LIM), α -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e coevaporado (COE).	51
Figura 15	Os espectros de infravermelho de limoneno (LIM), β -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e coevaporado (COE).	52
Figura 16	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 1000 x e 3000x de: α -CD; MF- α -CD+LIM; MA- α -CD+LIM; CoE- α -CD+LIM.	54
Figura 17	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 1000 x e 3000x de: β -CD; MF- β -CD+LIM; MA- β -CD+LIM; CoE- β -CD+LIM.	55
Figura 18	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 600x de: α -CD; MF- α -CD+LIM; MA- α -CD+LIM; CoE- α -CD+LIM.	56
Figura 19	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 600x de: β -CD; MF- β -CD+LIM; MA- β -CD+LIM; CoE- β -CD+LIM.	57
Figura 20	Representação molecular do complexo de inclusão do limoneno com α -CD (A) com energia de ligação de - 4.49kcal/mol e β -CD (B) com energia de ligação de - 4.04kcal/mol.	58
Figura 21	Curvas TG da α -ciclodextrina obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL.min ⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).	60
Figura 22	Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura para α -CD.	60
Figura 23	Curvas TG da mistura física α -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min ⁻¹ , sob atmosfera de N ₂ (100 mL.min ⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de Al. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).	61
Figura 24	Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da MF α -CD/Limoneno.	61
Figura 25	Curvas TG do complexo obtido por malaxagem da α -	62

ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

- Figura 26** Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da MA α -CD/Limoneno. 62
- Figura 27** Curvas TG do complexo obtido por co-evaporação da α -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe). 63
- Figura 28** Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da CE α -CD/Limoneno. 63
- Figura 29** Curvas TG da β -ciclodextrina obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe). 64
- Figura 30** Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da β -CD. 64
- Figura 31** Curvas TG da mistura física da β -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe). 65
- Figura 32** Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da MF β -CD/Limoneno. 65
- Figura 33** Curvas TG do complexo obtido por malaxagem da β -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe). 66
- Figura 34** Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da MA β -CD/Limoneno. 66

- Figura 35** Curvas TG do complexo obtido por co-evaporação da β -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe). **67**
- Figura 36** Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da CE β -CD/Limoneno. **67**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Percentuais de perdas de massa do limoneno (LIM), α -ciclodextrina (α -CD), mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) obtidos por termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG). **40**
- Tabela 2** Percentuais de perdas de massa do limoneno (LIM), β -ciclodextrina (β -CD), mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) obtidos por termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG). **41**
- Tabela 3** Determinação das razões de complexação pelos métodos da mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) em α -ciclodextrina (α -CD). **44**
- Tabela 4** Determinação das razões de complexação pelos métodos da mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) em β -ciclodextrina (β -CD). **44**
- Tabela 5** Resultados dos valores de energia de ativação para primeira etapa de decomposição térmica dos complexos de limoneno com α e β -ciclodextrina. **59**

RESUMO

O limoneno (LIM) é um monoterpeno monocíclico, sendo um dos principais constituintes de vários óleos essenciais de frutas cítricas, como laranja, tangerina e limão. Dentre os óleos essenciais encontrados nos cítricos em geral, o R-(+)-limoneno é seu componente majoritário, podendo atingir concentrações de 90 a 96%. As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, mais comumente encontradas com seis, sete ou oito unidades de glicose, denominadas respectivamente de α -CD, β -CD e γ -CD. São obtidas pela ação da enzima ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase) sobre o amido. As CDs são capazes de formar complexos de inclusão, alterando as propriedades físicas e químicas dos compostos complexados. O objetivo com este trabalho foi preparar e caracterizar físico-quimicamente complexos de inclusão de limoneno em α e β -ciclodextrina, estudando as propriedades do suposto complexo formado. Tal complexo foi preparado por meio das técnicas de mistura física, malaxagem e co-evaporação, e foi caracterizado por análise térmica (calorimetria exploratória diferencial-DSC e termogravimetria/termogravimetria derivada-TG/DTG); cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas-CG/EM; difração de raios X-DRX; espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier-FTIR; microscopia eletrônica de varredura-MEV, modelagem molecular (*Docking*) e estudo cinético de primeira etapa de perda de massa. Por meio dos resultados obtidos pelas análises foi possível evidenciar que tanto a α -CD quanto a β -CD formaram complexos de inclusão com o limoneno. No entanto, nas curvas DSC da α -CD que correspondem aos métodos de MA e CE foi possível observar um perfil diferente daquele observado para α -CD pura e MF. Nas curvas DSC para β -CD, observou-se que para o método CE apresentou perfil endotérmico mais significativo do que os métodos de MF e MA. De acordo com as análises TG/DTG para α -CD pode-se observar que o perfil termoanalítico dos complexos obtidos pelo método da MF, MA e CE foram semelhantes a α -CD. As curvas TG/DTG do limoneno mostra perda de massa em torno de 100% no intervalo de 30-169°C. A curva TG/DTG da α -CD mostrou duas etapas de perdas de massa (entre 25-120°C) somam 10,7% de perda de massa seguidas de decomposição e eliminação do material carbonáceo. Nas curvas TG/DTG da β -CD, MF, MA e CE que apresentaram um perfil termoanalítico similar aos complexos obtidos com a α -CD. Após a avaliação das perdas de massa mostradas na Tabela 2 pode-se verificar valores em torno de 8% para o MA e CE na faixa de temperatura entre 120 e 270°C, o que é um indicativo da maior capacidade de complexação do limoneno. Nos resultados para o CG/EM para α -CD foi possível observar que o MA encapsulou o limoneno em uma razão de 1:0,49 (limoneno: α -CD), mas em uma razão inferior ao CE 1:18,11 (limoneno: α -CD). Mostrando desta forma que a CE foi o melhor método, e para β -CD pode-se observar que não exibiu nenhuma complexação na MF e MA. Já a CE mostrou uma eficiência de complexação igual a 1:1,44, sendo assim considerado o melhor método de complexação quando comparado com o CE da α -CD. No padrão de difração de raios X da MF mostrou ser bastante similar aos encontrados da para a α -CD e β -CD puras. Esse é um indicativo da baixa eficiência de complexação. Ao observar as reflexões da MA e CE, pode-se verificar o surgimento de novos picos e a ausência de picos característicos da α -CD e β -CD puras. Na análise dos espectros no FTIR correspondentes aos complexos de inclusão obtidos pelos métodos da MF, MA e CE foi possível observar um perfil muito semelhante entre todas as amostras. Elas se assemelham a espectro da α -CD e β -CD puras devido aos complexos terem sido preparados em razão molar 1:1 (limoneno 136,24 g/mol e α -CD 972 g/mol). A MEV foi realizada para avaliar as mudanças nas características cristalinas na superfície das α -CD e β -CD puras e após a formação do complexo de inclusão, onde os resultados corroboram com os outros achados dos testes de caracterização. Na modelagem molecular (*docking*), os resultados teóricos mostraram estabilidade nas ligações entre α -CD/LIM (-4,49 kcal/mol) do que os observados entre β -CD/LIM (-4,04 kcal/mol), pois foi necessário menor gasto de energia entre α -CD/LIM do que entre β -CD/LIM. O estudo cinético da primeira etapa de decomposição foi introduzido neste trabalho para observar o comportamento térmico das α -CD e β -CD puras e dos complexos obtidos nas razões de aquecimento de 2,5-5,0-10 e 15 °C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL. min⁻¹).

Palavras-chave: limoneno, ciclodextrina, complexo de inclusão, monoterpeno, terpenos, *Docking*.

ABSTRACT

Limonene (LIM) is a monocyclic monoterpene, and one of the main constituents of several essential oils of citric fruits such as orange, tangerine and lemon. Among the essential oils found in citric fruits in general, R-(+)-limonene is the majoritarian component, which can reach concentrations from 90 to 96%. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides, most commonly found with six, seven or eight glucose units, known respectively as α -CD, β -CD and γ -CD. They are obtained through the action of the enzyme cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) on starch. The CDs are able to form inclusion complexes, altering the physical and chemical properties of the complexed compounds. The objective with this work was to prepare and characterize physical-chemically inclusion complexes of limonene in α - and β -cyclodextrin, studying the properties of the supposed complex formed. Such complex was prepared by means of physical mixture, malaxage and co-evaporation, and was characterized through thermal analysis (differential scanning calorimetry– DSC – and thermogravimetry/derivative thermogravimetry – TG/DTG); gas chromatography coupled to a mass spectrometry -GC/MS; X-ray diffraction – DRX; Fourier infrared transform – FTIR – absorption spectrophotometry; electronic scanning microscopy – ESM; molecular modeling (*Docking*) and kinetic study of first-phase mass loss. From the results obtained through the analyses, it was possible to point out that both the α -CD and the β -CD formed inclusion complexes with limonene. However, in the DSC curves of the α -CD, which correspond to the methods of MA and CE, it was possible to observe a profile that is different from that observed for pure α -CD and MF. In the DSC curves for β -CD, we observed that the CE presented an endothermic profile that was more significant than were the MF and MA methods. According to the TG/DTG analyses for α -CD, we can observe that the thermoanalytical profile of the complexes obtained through the MF, MA and CE methods were similar to that of α -CD. The TG/DTG curves of limonene show mass loss around 100% in the interval of 30-169°C. The TG/DTG curve of α -CD showed two phases of mass loss (between 25 and 120°C) that add up to 10.7% of mass loss followed by decomposition and elimination of carbonaceous material. The TG/DTG curves of β -CD, MF, MA and CE presented a thermoanalytical profile that was similar to the complexes obtained with α -CD. After the evaluation of the mass losses shown on Table 2, we can see figures around 8% for MA and CE in the temperature range between 120 and 270° C, what is an indicator of the higher capacity of limonene complexation. In the results of CG/EM for α -CD, it was possible to observe that MA encapsulated limonene in a ratio of 1:0.49 (limonene: α -CD), but in a ratio that was lower to CE 1:18.11 (limonene: α -CD). Thus, it is shown that CE was the best method, and also that β -CD did not show any complexation in MF and MA. CE showed complexation efficiency of 1:1.44, being considered as the best method for complexation when compared to CE of α -CD. The standard of X-ray diffraction of MF was shown to be quite similar to those found for pure α -CD and β -CD. That is an indicator of low efficiency of complexation. By observing the reflections of MA and CE, we can verify the onset of new peaks and the absence of characteristic peaks of pure α -CD and β -CD. In the analysis of the FTIR spectra corresponding to the inclusion complexes obtained through the methods of MF, MA and CE, it was possible to observe a profile that was quite similar among all the samples. They resemble the spectrum of pure α -CD and β -CD due to the fact that the complexes have been prepared in a molar ratio of 1:1 (limonene 136.24 g/mol and α -CD 972 g/mol). MEV was performed to evaluate the changes in the crystalline characteristics on the surfaces of pure α -CD and β -CD and after the formation of the inclusion complex, where the results corroborate other findings of the characterization tests. In the molecular modeling (*docking*), the theoretical results showed more stability in the ligations between α -CD/LIM (-4.49 kcal/mol) than what was observed between β -CD/LIM (-4.04 kcal/mol), once that a lesser expenditure of energy was necessary between α -CD/LIM in relation to that between β -CD/LIM. The kinetic study of the first phase of decomposition was introduced in this work in order to observe the thermal behavior of the pure α -CD and β -CD, as well as of the complexes obtained in the warming ratios of 2.5-5.0-10 and 15 °C.min⁻¹, under nitrogen dynamic atmosphere (100 mL. min⁻¹).

Key-words: limonene, cyclodextrin, inclusion complex, monoterpene, terpenes, *Docking*.

Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (SANTOS et al, 2013; PINHO et al, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, contam com medicamentos derivados de plantas para assistência médica. Neste sentido é de fundamental importância promover o resgate, o conhecimento e a valorização das práticas tradicionais e populares de uso de plantas medicinais (CAFITO, 2009).

Diversas espécies vegetais vêm sendo utilizadas para fins terapêuticos desde os primórdios da humanidade. O ser humano, por meio do uso das plantas medicinais, passou a buscar no meio ambiente a cura de doenças e o alívio de sintomas prejudiciais à sua saúde (BORGES et al, 2010). Todo este conhecimento adquirido ao longo dos anos, das espécies vegetais e seus constituintes, vem servindo de direcionamento para as pesquisas em desenvolvimento de acordo com o uso da medicina tradicional para prevenção, tratamento e cura de enfermidades (DE VOS, 2010; LEONTI et al, 2011).

Os terpenos estão entre as classes de produtos naturais de ampla ocorrência em plantas superiores (COLOMA et al, 2011). Esses compostos podem ser encontrados também em organismos marinhos, algas, microrganismos e em menor extensão em fungos (ZHOU et al, 2013; TCHIMENE et al, 2013). Apresentam uma diversidade estrutural derivada da junção cabeça-cauda de unidades de cinco átomos de carbonos chamadas de unidades isoprênicas. As estruturas químicas formadas através da ligação de duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades isoprênicas são chamadas de mono, sesqui, di, sester, tri e tetraterpenos, respectivamente (FINK 2013, ZHOU et al, 2013). Dessas classes, os mono, di e sesquiterpenos são os principais contribuintes para os perfis aromáticos de frutas, flores, resinas e óleos essenciais (DEL TERRA et al, 2013). Os representantes das demais classes são em sua maioria sólidos e podem ser encontrados na forma livre, glicosilados ou como ésteres. Até o momento, estima-se que haja aproximadamente 30.000 terpenos identificados, sendo 4.000 referentes a triterpenos (KUPSKA et al, 2014).

Entre os terpenos pesquisados nos vegetais com atividades biológicas, encontra-se o limoneno (Lim), que além de ser um produto natural, é o principal constituinte das frações terpenóides dos óleos de limão e laranja. O limoneno apresenta baixa toxicidade, apelo comercial muito importante na área de cosméticos e alimentos, além de apresentar alguns potenciais farmacológicos interessantes, tais como: ação antimicrobiana (SENATORE et al, 2013), antioxidante (ALMEIDA et al, 2014), antitumoral (BICAS et al, 2011), inseticida (KURDELAS et al, 2012), ansiolítico (LIMA et al, 2013), antiparasitária (GRAEBIN et al, 2010) e atividade repelente (SANTOS et al, 2011).

Apesar das vantagens farmacológicas apresentadas pelo limoneno, este mostra algumas características indesejáveis, como baixa solubilidade em água e alta volatilidade, necessitando do desenvolvimento de sistemas que possam melhorar suas propriedades físico-químicas, além de aumentar sua estabilidade, segurança e efetividade (CIOBANU et al, 2013). A procura por novos excipientes e tecnologias, tem levado a indústria farmacêutica e a comunidade científica à pesquisa por novas formulações que resultem em preparações mais estáveis e melhoras terapêuticas.

As ciclodextrinas (CDs) na forma de complexos de inclusão têm sido um dos principais recursos empregados nas mais diversas áreas nos últimos anos (GIDWANI & VYAS, 2014). Sua conformação espacial em forma de cone, com sua parte externa hidrofílica e uma cavidade interna relativamente apolar, permite a formação de complexos de inclusão com várias moléculas (KURKOV & LOFTSSON, 2013). A complexação em ciclodextrinas provoca alterações nas características físico-químicas intrínsecas das moléculas “hóspedes”, no que se refere à solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade, proteção oxidativa, redução, racemização, isomerização, polimerização e hidrólise (JANSOOK & LOFTSSON, 2009).

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da degradação enzimática do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase, a qual pode ser produzida por diferentes microrganismos, nomeadamente do gênero *Bacillus macerans* (CEVALLOS et al, 2010). São compostas principalmente por seis, sete ou oito unidades de glicose, unidas por ligações do tipo α -1,4, denominadas respectivamente de α , β e γ -CD, têm o formato de cone truncado, sendo hidrofílicas no seu exterior e hidrofóbicas no seu interior, capazes de acomodar uma variedade

de fármacos e outras substâncias lipofílicas, o que favorece a formação de complexos de inclusão com moléculas orgânicas e inorgânicas (LYRA et al, 2010; RAOOV et al, 2014). Das CDs naturais, a mais amplamente utilizada é a β -CD, devido ao seu baixo custo e ao tamanho de sua cavidade ser apropriado para acomodar uma grande variedade de fármacos (PESCITELLI et al, 2010). O diâmetro da cavidade interna da α -CD é muito pequeno, o que desfavorece o seu uso com algumas substâncias de alto peso molecular, e apresenta alto custo. A γ -CD também apresenta um custo muito elevado, o que torna o seu uso desfavorável. Uma característica negativa das β -CD é a sua solubilidade aquosa limitada em relação às demais, que se deve, em grande parte, às ligações intramoleculares de hidrogênio entre os grupos hidroxil secundários, o que limita a interação desta CD com as moléculas de água (ÇELIK et al, 2011).

Inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos relatando a importância das CDs e suas aplicações difundidas nas mais diversas áreas, como por exemplo, em alimentos, cosméticos, repelentes, higiene pessoal e indústria têxtil, para várias finalidades, como mascarar sabor e odor desagradáveis, fixar substâncias voláteis, proteger substâncias sensíveis à luz ou ao oxigênio, diminuir efeitos colaterais de fármacos e prevenir interações entre eles (ÇELIK et al, 2011; PINHO et al, 2014). No entanto, ainda são escassos na literatura dados referentes ao processo de interação CD-hospedeiro e estudos comparativos entre diferentes ciclodextrinas, utilizando um determinado composto.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar físico-quimicamente complexos de inclusão de limoneno em α e β -ciclodextrina. Para avaliar o efeito do tamanho da cavidade na afinidade e eficiência de complexação com o limoneno foram utilizados três diferentes métodos de preparação: mistura física, malaxagem e co-evaporação. Para caracterização foram utilizadas a análise térmica (calorimetria exploratória diferencial-DSC e termogravimetria/termogravimetria derivada-TG/DTG); cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas-CG/MS; difração de raios X-DRX; espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier-FTIR; microscopia eletrônica de varredura-MEV e Modelagem Molecular (*Docking*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Preparar e caracterizar físico-quimicamente complexos de inclusão de limoneno em α e β -ciclodextrina.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar complexos de inclusão de limoneno (CIL) com ciclodextrinas (CDs) por três diferentes métodos (mistura física, malaxagem e co-evaporação);
- Avaliar o perfil de decomposição térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) do limoneno e dos complexos obtidos.
- Comparar a taxa de complexação do limoneno a partir dos três diferentes métodos de obtenção utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS).
- Caracterizar a estrutura dos complexos contendo limoneno por meio da técnica de difração de raios X (DRX).
- Caracterizar os complexos de inclusão utilizando a espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).
- Analisar qualitativamente a formação dos complexos de inclusão contendo o limoneno nos três diferentes métodos de obtenção utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Realizar um estudo de *docking* entre o limoneno e a α e β -CD, visando observar os principais sítios de interação hóspede-hospedeiro.
- Avaliar a cinética da primeira etapa de decomposição térmica dos compostos isolados e dos complexos utilizando o método não-isotérmico de Ozawa.

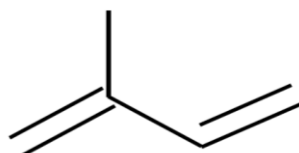
Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Terpenos

Terpenos, terpenóides ou isoprenóides são três denominações utilizadas para designar uma extensa e numerosa família de produtos naturais (LOHR et al, 2012). O termo isoprenóide indica que estes compostos são provenientes da condensação de duas ou mais unidades de isopreno (2-metil-butadieno) (Figura 1), quando submetidos a altas temperaturas (YANG et al, 2013). O termo terpeno refere-se apenas aos hidrocarbonetos insaturados (alcenos), no entanto, pode ocorrer a adição de um ou mais átomos de oxigênio na forma de grupos funcionais álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos na molécula terpênica, e, se esta preservar a estrutura das unidades isoprênicas, tal composto passa a ser chamado de terpenóide. Embora haja essa divisão, os três termos são frequentemente utilizados alternadamente para descrever os mesmos compostos (LOHR et al, 2012).

Figura 1: Estrutura molecular plana do isopreno, unidade básica para formação de terpenóides.



ISOPRENO

Os terpenos atuam nas plantas desempenhando diferentes funções, como por exemplo, na produção de hormônios (giberelinas) (DEL TERRA et al, 2013); pigmentos fotossintéticos (carotenóides) (LATOWSKI et al, 2014), carreadores de elétrons (ubiquinonas) (PUTIGNANI, et al, 2013), em mecanismos de defesa (NIU et al, 2012), crescimento (SCHMIDERER et al, 2010) e reprodução (MAY et al, 2013).

A classificação dos terpenos é feita de acordo com o número de unidades isoprênicas, que formam a sua estrutura, sendo nomeadamente: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos (GOUNARIS, 2010; KLEINE & MÜLLER, 2013; MARIENHAGEN & BOTT 2013).

Os hemiterpenos (C₅) são os menores grupo dos terpenos, sendo o próprio isopreno o representante do grupo mais conhecido e estudado. Tal composto é volátil, sendo liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CZECH et al, 2011).

Os monoterpenos (C₁₀) são compostos por duas unidades de isopreno (FENG et al, 2014). Devido a sua baixa massa molecular, estes costumam ser voláteis, atuando na atração de polinizadores (MADRONICH et al, 2012; DEL TERRA et al, 2013). Os monoterpenos podem ser isolados por destilação ou extração. O primeiro monoterpeno a ser isolado foi a “turpentina” (C₁₀H₁₆) na década de 1850 na Alemanha (THORMAR, 2011). Atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenóides naturais e alguns têm sido empregados nas indústrias de perfumes e fragrâncias, produção de especiarias, culinária, indústria de alimentos e condimentos (LÜDDEKE et al, 2012; VIEIRA et al, 2013).

Os monoterpenos podem ocorrer em pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e em canais oleíferos (GRAUSGRUBER-GRÖGER et al, 2012). Eles podem estar estocados em flores, como as de laranjeira, folhas, como no capim-limão, nas cascas dos caules, como na canela, na madeira, como no sândalo ou no pau-rosa, e em frutos como nos de erva-doce (SADDIQ & KHAYYAT, 2010; RACHWALIK et al, 2012).

Os sesquiterpenos (C₁₅) junto com isopreno e monoterpenos compreendem as classes de terpenóides mais encontradas em compostos voláteis presentes nos vegetais (NAGEGOWDA, 2010). Na indústria, óleos essenciais ricos em sesquiterpenos são bastante utilizados em fragrâncias na produção de perfumes caros e produtos de higiene pessoal (HARTWIG et al, 2014). Nas plantas, possui a função de afastar herbívoros (MCCORMICK et al, 2012), atrair agentes polinizadores (THOLL et al, 2011), além de possuir atividade fungicida (PARK et al, 2009).

Os diterpenos (C₂₀) compreendem um grande grupo de compostos, possuem 20 carbono e 32 átomos de hidrogênio, já foram identificados nos óleos essenciais presentes nas folhas e resinas (MATSUNAGA et al, 2012), exercem funções marcadores taxonômicos (MOREIRA et al, 2014) agentes anticancerígenos (TSUKUI et al, 2014).

Os triterpenos (C₃₀) são, em grande parte, derivados de óleos vegetais, cereais e frutas (SIDDIQUE & SALEEM, 2011). Entre os triterpenos, está uma importante classe de substâncias, os esteróides, os quais são componentes dos

lipídios de membrana de plantas (SALEEM, 2009) e de importância fisiológica, como por exemplo, hormônios esteróides (ELSEBAI et al, 2013). Uma outra classe relevante de triterpenos são as saponinas (ARSLAN et al, 2013), devido a sua importância comercial e farmacêutica, como no uso de medicamentos, detergentes, adjuvantes e cosméticos (PERTUIT et al, 2014). Como o próprio nome indica, as saponinas são prontamente reconhecidas pela formação de espumas em água, semelhantes as de sabão (NAOUMKINA et al, 2010; WENG et al, 2010). Essas substâncias são semelhantes ao sabão porque possuem uma parte hidrossolúvel (glicose) e outra lipossolúvel (triterpeno) (ARSLAN et al, 2013). Nas plantas, as saponinas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos (NAOUMKINA et al, 2010).

Os tetraterpenóides (C₄₀) são carotenóides, pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, desempenham função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos (LICHTENTHALER, 2010; DAHM & GOLINSKA, 2011).

Os politerpenóides são aqueles com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (GARCÍA & CARRIL, 2009; LICHTENTHALER, 2010).

3.2. Limoneno

O limoneno é um monoterpene monocíclico, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno (BADEE et al, 2011), de fórmula molecular C₁₀H₁₆. É um dos principais constituintes de vários óleos voláteis das cascas de frutas cítricas (LU et al, 2014), com propriedades terapêuticas (LI & CHIANG, 2012) e aromáticas (ZHANG et al, 2014). A temperatura ambiente é líquido, límpido e incolor (NIKFAR & BEHBOUDI, 2014). Pode-se citar alguns de seus derivados mais notáveis, como os compostos oxigenados: α -terpineol, álcool perílico, carveol, carvona e mentol (GUTIERREZ et al, 2013).

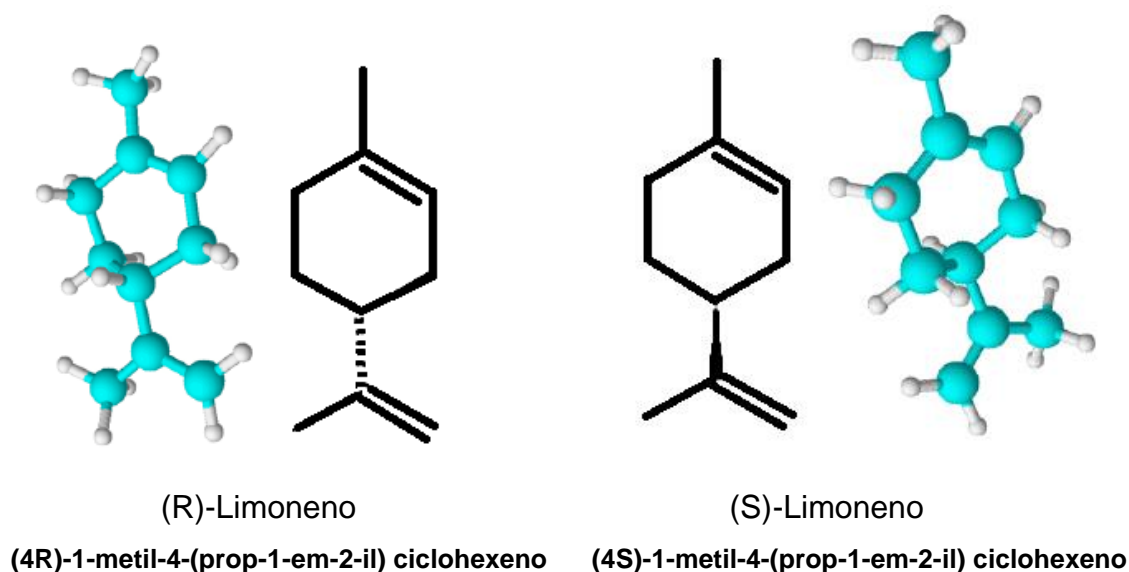
Elevadas concentrações de limoneno podem ser obtidas por meio de resíduos da indústria de sucos cítricos (BADEE et al, 2011), tendo despertado grande interesse por ser uma fonte renovável, de fácil obtenção e de baixo custo (BADEE et al, 2011; ARRIETA et al, 2013). Geralmente, é extraído por uso de pressão ou

arraste a vapor, a partir das cascas de algumas espécies de citrus, como por exemplo, laranja, tangerina, limão e bergamota, e está presente em uma série de outros óleos essenciais, podendo também ser encontrado na sua forma enantiomérica (KIYOTA et al, 2014; MURALI et al, 2012).

Dentre os óleos essenciais encontrados nos cítricos em geral, o R-(+)-limoneno é seu componente mais expressivo, podendo atingir concentrações de 90 a 96% (VEILLET et al, 2010; BADEE et al, 2011; ARRIETA et al, 2013).

O (R)-(+)-limoneno (Figura 2) também é conhecido como d-limoneno, o (S)-(-)-limoneno (Figura 2) é chamado de l-limoneno (KIYOTA et al, 2014), e a mistura das quantidades idênticas desses isômeros é chamada de dl-limoneno ou (\pm) limoneno ou como diterpeno. O (R)-(+)-limoneno é o principal constituinte do óleo essencial de laranja (LIMA et al, 2013) o qual confere a essa fruta o aroma característico, já o (S)-limoneno tem um odor semelhante ao petróleo (KIYOTA et al, 2014). Os isômeros configuracionais – *d*-limoneno e *l*-limoneno, não se distribuem de forma homogênea nos diversos vegetais, onde são comumente encontrados (RAMOS, 2010).

Figura 2: Fórmulas moleculares dos isômeros R e S limoneno, e suas respectivas nomenclaturas comerciais e sistemática segundo a IUPAC.



É possível obter enorme quantidade de limoneno, isolado a partir de plantas medicinais de várias espécies, como a *Salvia* (KUMAR et al, 2010), *Citrullus colocynthis* (JAYARAMAN et al, 2009), *Citrus medica* L. cv. Diamante (MENICHINI et al, 2011), *Adansonia digitata* (MURALI et al, 2012), *Curcuma longa* (USMAN et al, 2009). Estas plantas têm sido utilizadas popularmente para tratamento de diabetes, anti-hiperlipidêmico, diarreia, cefaléia, hipertensão, inflamação e reumatismo (MURALI et al, 2012).

O limoneno é um dos monoterpenos mais investigados quanto a atividade quimiopreventiva (LI & CHIANG, 2012) e quimioterapêutica (JING et al, 2013). Os principais relatos sobre a inibição de carcinogênese, induzida quimicamente em roedores, sugerem que o limoneno apresenta efeito protetor contra o câncer de mama, pele, fígado, pulmões, pâncreas, na próstata (ARRUDA et al, 2009; BICAS et al, 2011) e estudos demonstraram atividade preventiva de cancro *in vivo* (LAPPAS & LAPPAS, 2012).

Ao d-limoneno atribui-se diversas atividades biológicas, onde pode-se destacar as suas propriedades antioxidantes (MURALI et al, 2012), antiinflamatória (JING et al, 2013), antinociceptiva (YUN, 2014), ansiolítica (DE ALMEIDA et al, 2012), antimicrobiana (LENNARTSSON et al, 2012), anti-hipertensiva (JING et al, 2013) e efeito neutralizador de ácido gástrico (CHEN et al, 2013).

D-limoneno é listada na regulamentação do código federal por geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pelo uso como agente aromatizante e é usado em alimentos como sucos de frutas, refrigerantes, sorvetes e sobremesas. Em humanos, o d-limoneno demonstrou baixa toxicidade em uso contínuo de até 1 ano (JING et al, 2013).

Estudos relataram que o d-limoneno reduziu significativamente a glicemia em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ) (SHU, 2010), e reduziu a resistência à insulina em ratos com dieta rica em gordura e a doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por de N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (SANTIAGO et al, 2012; JING et al, 2013).

O d-limoneno é considerado um solvente biodegradável, inofensivo para o ser humano, amplamente utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica, como inseticida, além das suas aplicações como solvente para fins de limpeza, tais como a remoção de petróleo em peças de máquinas (OBEROI et al, 2011; NIKFAR &

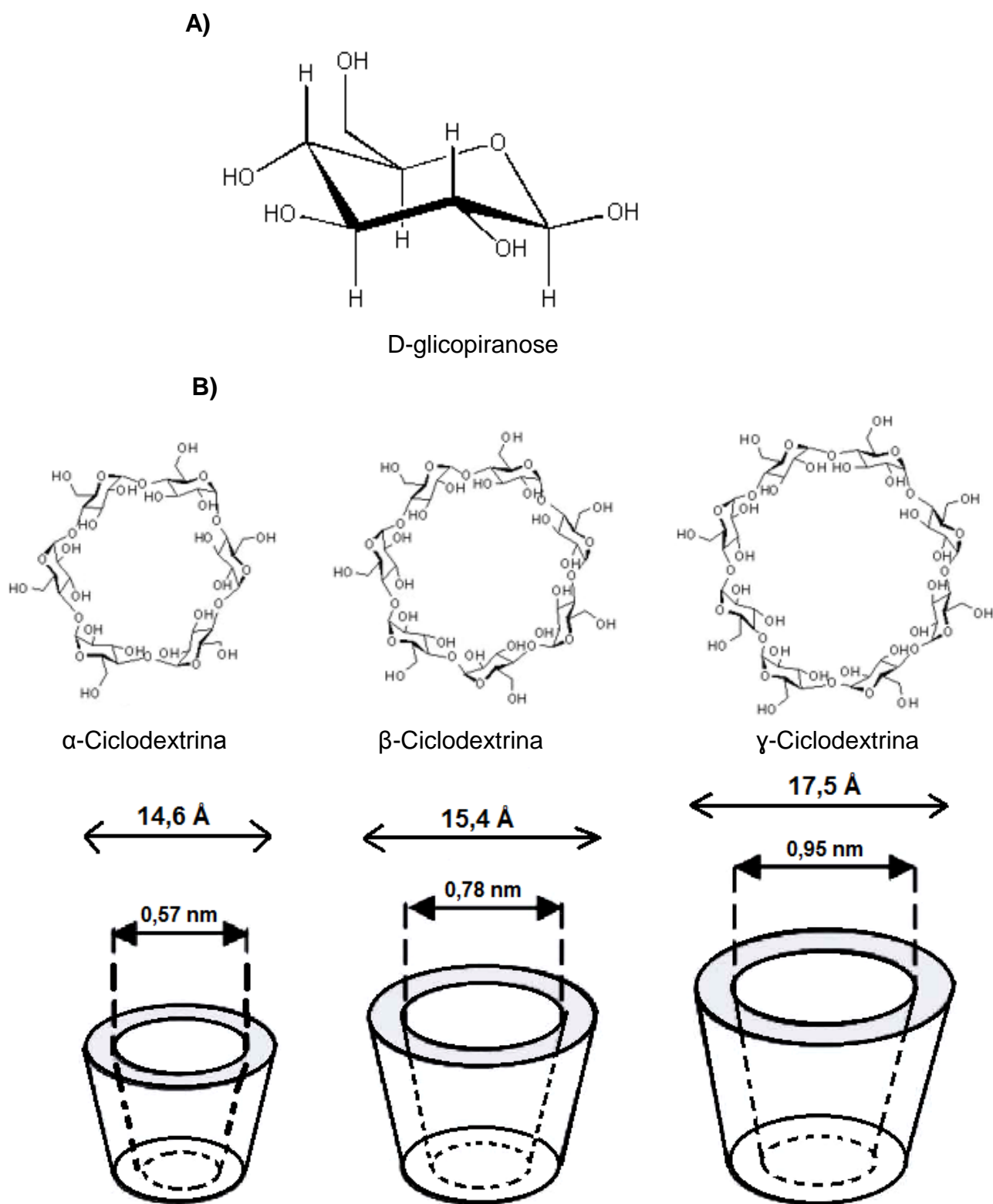
BEHBOUDI, 2014) e aditivo aromático em perfumes, sabonetes, alimentos e bebidas (LAPPAS & LAPPAS, 2012).

3.3. Ciclodextrinas (CDs)

As CDs naturais são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêutica, nas indústrias de alimentos e cosméticos (CEVALLOS et al, 2010). Na indústria farmacêutica são utilizadas como agentes complexadores para aumentar a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis, assim como para aumentar a sua biodisponibilidade e estabilidade (KURKOV & LOFTSSON, 2013).

As CDs foram descobertas pela primeira vez por Villiers em 1891, a partir do produto de degradação do amido em um meio de cultura de *Bacillus amylobacter*, a qual denominou "celulosina", por suas características semelhantes à celulose (ZAFAR et al, 2014). No entanto, foi Schardinger que fez a maior parte da caracterização de CDs e determinou que elas fossem denominadas por oligossacarídeos cíclicos, por isso, também são conhecidas por ciclomaltose, cicloamilose ou dextrinas de Schardinger (ELLOUZE et al, 2011). São formadas por unidades de D-glicopirranose (Figura 3A), unidas pela ligação α -1,4'-glicosídica, sendo que, naturalmente, as três ciclodextrinas mais abundantes são α , β e γ -ciclodextrina, que são compostas por 6, 7 e 8 unidades de repetição de D-glicopirranose, respectivamente (Figura 3B) (MARQUES 2010; BELICA et al, 2014).

Figura 3: Representação estrutural da A) D-glicopirranose e das B) ciclodextrinas.
 Fonte: ASTRAY et al, 2009; SOUSA, 2010; ZORNIO 2013. Figura adaptada pela autora.

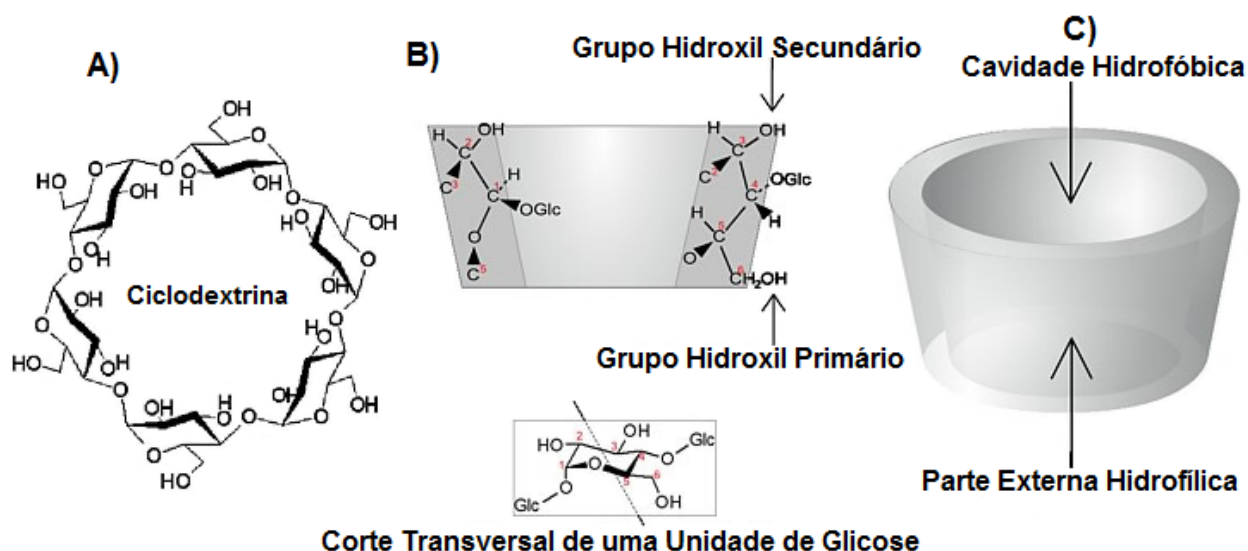


Como na amilose, as unidades de glicopirranose adotam a conformação estrutural de cadeira, fazendo com que as CDs se apresentem na forma de cones truncados, devido à conformação espacial dos seus grupos OH (ZAFAR et al, 2014). Essa conformação estrutural é extremamente rígida – a única rotação livre presente na molécula se deve ao grupo CH₂OH ligado ao C6 e há uma pequena liberdade rotacional da ligação glicosídica – e é isso que faz com que as hidroxilas secundárias (presentes em C2 e C3) interajam por ligações de hidrogênio, fazendo com que uma extremidade do cone seja mais aberta em relação à outra, onde estão localizadas as hidroxilas primárias. Tal conformação também é responsável pelo caráter mais importante das CDs: a presença de uma “parte externa” hidrofílica e de uma cavidade hidrofóbica; uma vez que todos os grupos polares (OH) estão orientados nas extremidades das CDs, o interior é “preenchido” apenas pelos grupos apolares C3-H, C5-H e C-O-C glicosídico (a conformação em cadeira, a orientação dos grupos OH e a estrutura das CDs são mostradas na Figura 4) (SONGKRO et al, 2012).

As CDs apresentam propriedades específicas para formar complexos de inclusão de acordo com cada molécula (RAJENDIRAN et al, 2014). Essa capacidade de inclusão com vários compostos, depende do ajuste adequado da molécula hóspede na cavidade hidrofóbica da CD (ZHANG & MA, 2013). A formação dos complexos de inclusão é determinada pelas características da molécula hóspede, como a polaridade, o tamanho e a geometria, e devem ser adequadas às características e ao tamanho da cavidade da CD (ASTRAY et al, 2009).

Figura 4: A) Estrutura molecular da ciclodextrina, B) corte transversal de uma molécula de ciclodextrina que mostra a disposição de uma unidade de glicose e a C) representação cônica mostrando parte exterior hidrofílica e cavidade hidrofóbica.

Fonte: SRINIVASAN et al, 2011; BRITTO et al, 2004. Figura adaptada pela autora.



As dimensões das CDs são consequência do número de glicopiranoses presentes em suas estruturas. No quadro abaixo estão contidas as principais informações das CDs (SZEJTLI, 1998).

Quadro 1: Principais dimensões das estruturas cônicas das ciclodextrinas.

Propriedades	α -ciclodextrina	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina
Número de glicopiranoses	6	7	8
Massa molar (g.mol. ⁻¹)	972,84	1134,98	1297,12
Diâmetro externo da cavidade mais larga (nm)	1,37	1,53	1,69
Diâmetro interno da cavidade mais larga (nm)	0,57	0,78	0,95
Altura do cone (nm)	0,79	0,79	0,79
Volume da cavidade (nm ³)	0,174	0,262	0,427

Fonte: (SZEJTLI, 1998)

Outro fator importante determinado pelas unidades de glicopiranoses é a solubilidade em água das CDs, cujos valores estão descritos no Quadro 2, juntamente com a porcentagem de água de cristalização.

Quadro 2. Solubilidade em água e porcentagem de água de hidratação para as ciclodextrinas naturais.

Parâmetro	α-ciclodextrina	β-ciclodextrina	γ-ciclodextrina
Solubilidade em água (mmol.L ⁻¹ , 25 °C)	149	16,3	179
Água de hidratação (% m/m)	10,2	13,2 – 14,5	8,1 – 17,7

Fonte: (SZEJTLI, 1998)

O que se percebe é que a solubilidade da β -CD é bem baixa em comparação as outras duas CDs (SANGPHEAK et al, 2014); isso é explicado devido à estruturação do cone pelas sete moléculas de D-glicopiranosose, que possibilitam que ocorram ligações de hidrogênio entre todas as hidroxilas C2 de uma unidade com a C3 da unidade adjacente, conferindo uma estrutura bem rígida à molécula. Já para a α -CD, uma das unidades de glicopiranosose é distorcida, impedindo que haja ligação de hidrogênio em todos os grupamentos e o tamanho da γ -ciclodextrina permite que esses grupos não sejam coplanares e não interajam entre si (LOFTSSON E BREWSTER, 2010; ZORNIO, 2013).

Assim, a conformação das CDs em cones contendo uma cavidade hidrofóbica e um exterior hidrofílico permite que esses compostos encapsulem em seu interior moléculas apolares, formando os chamados complexos de inclusão (SRINIVASAN et al, 2011; LI et al, 2014; BELICA et al, 2014).

3.4. Complexos de Inclusão

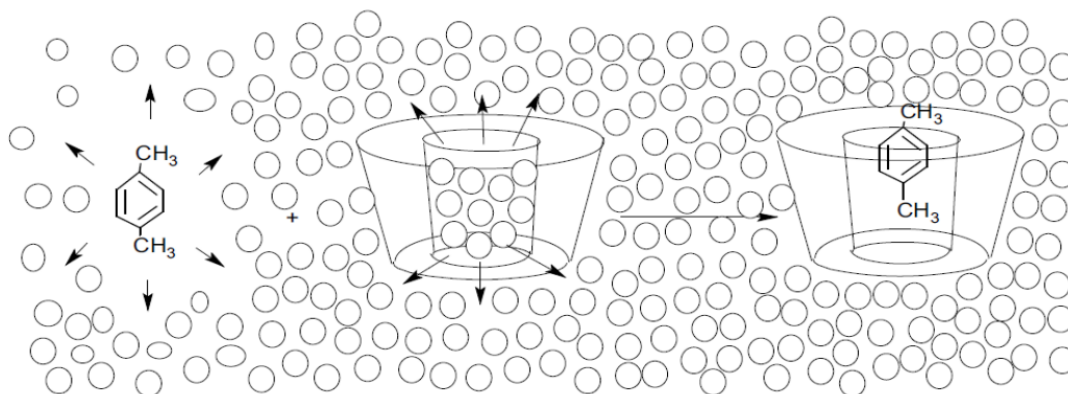
As CDs podem formar complexos de inclusão tanto em meio líquido quanto no estado sólido (YUAN et al, 2014), onde após a complexação são capazes de melhorar as características físico-químicas da “molécula hóspede” (CASTRONUOVO & NICCOLI, 2013). As CDs podem reduzir a volatilidade, viabilizar compostos líquidos na forma sólida, mascarar o odor e o sabor desagradável de

alguns compostos, evitar incompatibilidades indesejáveis, aumentar a biodisponibilidade e a estabilidade na presença de luz, calor e condições oxidantes (SANTOS et al, 2012; ROCHA et al, 2012).

Os complexos de inclusão podem ser obtidos por diferentes métodos, tais como: co-precipitação (PETROVIC et al, 2010), co-evaporação (MENNINI et al, 2014), liofilização (FERNANDES et al, 2009), mistura física (RIEKES et al, 2010), *spray drying* (MARTÍN et al, 2010), malaxagem (PETRALITO et al, 2014), moagem (MENNINI et al, 2014) e mediante o emprego da tecnologia do fluido supercrítico (CAPUTO et al, 2013; ZAFAR et al, 2014).

Dessa forma, de modo geral, tem-se que um complexo de inclusão é um composto formado pela CD contendo um substrato em sua cavidade. A força motriz do processo de complexação, tem origem nas moléculas de água presentes no interior do oligossacarídeo, cuja esquematização pode ser observada na Figura 6, na qual se tem a CD dissolvida em água devido às interações de hidrogênio. Sua cavidade também está preenchida por moléculas de água, porém em condição energeticamente favorável, possibilita que o composto hidrofóbico presente em suspensão no meio, as substitua prontamente (ASTRAY et al, 2009). Dessa forma, as contribuições termodinâmicas mais importantes para a formação dos complexos de inclusão, são decorrentes da entrada do substrato hidrofóbico na cavidade da CD e da quebra da rede cristalina de água, o que caracteriza um processo tipicamente de efeito hidrofóbico. Determina-se então que as interações entre a CD e o substrato são devido às forças intermoleculares, não ocorrendo reações químicas entre eles, e, dependendo de como essas forças se estabelecem, podem ser obtidos complexos de inclusão em solução ou em fase sólida (MURA, 2014).

Figura 5: Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão em meio aquoso. A molécula-hospedeira é o p-xileno e as moléculas de água estão representadas por círculos. Fonte: Adaptado pela autora de ASTRAY et al, 2009.



O fenômeno de reconhecimento molecular, responsável pela ligação do composto com a CD, envolve interações não covalentes, tais como: ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, efeito hidrofóbico, interações do tipo dipolo-dipolo, transferências de cargas e efeitos estéricos (SUTHARI et al, 2014; ZOU et al, 2014).

A discriminação estereosseletiva, durante a formação do complexo, emerge das diferenças que o composto em estudo apresenta para se adaptar à cavidade da CD e o ajuste espacial, é considerado o fator mais importante para que ocorra o processo de complexação. Desta forma, para moléculas pequenas é mais fácil formar complexos com α e β -CD devido à compatibilidade do volume do substrato e da CD. Já no caso da γ -CD, se o substrato for muito pequeno o encaixe torna-se desfavorável devido ao tamanho muito maior da cavidade desta CD (HATARA, 1998; VENTURINI, 2005).

Os compostos viáveis de formar complexos de inclusão são extensos (ANCONI et al, 2012), podendo-se citar os compostos alifáticos de cadeia linear ou ramificada, aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos orgânicos, ácidos graxos, compostos aromáticos e aminas, que podem se apresentar nos estados sólido, líquido e gasoso (DEL VALLE, 2004). Devido a essa gama de possibilidades, vários métodos de preparação dos complexos de inclusão são reportados a fim de se adequar melhor ao sistema disponível, porém, todos eles se baseiam no mesmo princípio de

substituição das moléculas de água presentes na cavidade hidrofóbica das CDs (PANDIT et al, 2011).

O método mais utilizado em escala laboratorial é o da co-evaporação, onde tal procedimento consiste na dissolução da CD em solução aquosa, na qual o substrato em potencial é adicionado sob agitação constante, em um béquer e um agitador magnético, logo após o tempo determinado, o material é levado para secagem em dessecador, e posteriormente triturado e armazenado em frasco hermeticamente fechado (ZHU et al, 2012). Como alternativa a esse método podem ser empregados as preparações por suspensão ou maceração. No primeiro caso faz-se uma suspensão de CD em quantidades de água que excedam em torno de 40 % da água necessária para a solubilização total da amostra, adicionando-se o substrato; à medida que o complexo vai sendo formado, ele precipita, já que é menos solúvel que o oligossacarídeo puro, fazendo com que a CD sólida se solubilize, mantendo o equilíbrio e formando mais produtos. Já no método da maceração, a quantidade de água reduz para 20 %, o que torna a mistura CD-substrato pastosa e muito viscosa; sendo necessária que a agitação ocorra por equipamentos especializados, demandando também mais tempo e temperaturas mais elevadas (HAIYEE et al, 2009).

Com o auxílio de métodos adequados pode-se caracterizar não só a formação do complexo, como determinar a eficiência de incorporação e a interação entre os compostos. Essas evidências são consequências das mudanças físico-químicas que ocorrem no substrato e na CD quando na forma de complexo de inclusão, podendo ser determinadas utilizando-se técnicas espectrométricas, térmicas, micrográficas, condutimétricas e simulações computacionais (YANG et al, 2011).

3.5. α -Ciclodextrina

A alfa-ciclodextrina (α -CD) é composta de seis unidades de glicose, pode ser fabricada biotecnologicamente por meio da degradação enzimática de matérias-primas vegetais, como o milho e batata. Enzimas específicas (ciclodextrinas glicosiltransferases ou CGTases) cortam seções individuais do carboidrato helicoidal do amido e as agrupam em proporções que dependem do tipo de enzima utilizada (ZAFAR et al, 2014).

A α -CD é um sólido de cor branca, não-higroscópico, homogêneo e estável a temperatura de até aproximadamente 100°C. Possui aplicações importantes, tais como, promover a solubilidade aquosa de substâncias, aumentar a estabilidade de compostos, reduzir os efeitos tóxicos, viabilizar formas líquido em sólidos, além de aplicações como agente emulsificante (BAI et al, 2012). Estas moléculas de estrutura anelar são estáveis em soluções alcalinas, mas hidrolisadas em soluções ácidas (pH < 2,5), comercialmente possuem alto custo. Esta CD é frequentemente utilizada para complexar moléculas de baixo peso molecular, por possuir uma cavidade menor quando comparada a β e γ -CD (ÇELIK et al 2011; BAI et al, 2012).

Após a administração intramuscular, a α -CD liga-se a alguns lípidos, desencadeia uma ação relativamente irritante e pode também provocar alguma irritação ocular. Na administração oral em ratos entre 2 e 3 % da dose é absorvida. Por esta via não sofre metabolismo no trato intestinal superior e a ruptura do anel ocorre por ação da flora intestinal do cólon e cego. A excreção depois da administração oral em ratos foi de 60% como CO₂, 26-33% incorporada em metabólitos e 7-14 % como metabólitos nas fezes e urina, principalmente excretados inalterados pela via renal. A DL₅₀ após a administração oral em estudos com rato foi > 10.000 mg/Kg. Depois da administração intravenosa com t_{1/2} = 25 min, a DL₅₀ intravenosa observada em ratos ficou entre 500 e 750 mg/Kg (MARTIN DEL VALLE, 2004). A α -CD pode ser encontrada em formulações parenterais em baixas concentrações (KURKOV & LOFTSSON, 2013).

Estudos realizados por Linde e colaboradores (2008) teve por objetivo determinar a constante de formação do complexo de inclusão entre a alfa-ciclodextrina e o aminoácido triptofano. Os resultados desse estudo mostraram que o triptofano complexa com a α -ciclodextrina facilitando a entrega metabólica além de reduzir o sabor indesejado.

Estudo realizado por Rajendiran e colaboradores (2013) compararam a formação de complexos de inclusão entre a sulfapiridina e ciclodextrinas. Os resultados mostraram que tanto a α -CD quanto a β -CD podem ser utilizadas para complexar com este fármaco higroscópico e servir como veículo de liberação controlada.

3.6. β -Ciclodextrina

A β -ciclodextrina (β -CD) é um pó cristalino de cor branca, homogênea, não-higroscópica, produzida a partir de fontes naturais renováveis (amido), por intermédio de uma conversão enzimática simples, composta de sete unidades de glicose (DING et al, 2011). Em meio alcalino é bastante estável e hidrolisa-se em meio fortemente ácido, apresenta custo relativamente baixo para a maioria das aplicações industriais (VALENTE & SÖDERMAN, 2014).

Existem diversos trabalhos publicados com este tipo de CD, pois apesar da sua limitada solubilidade em água (solubilidade em água a 20 °C; 1,85 g/100 mL), é a CD natural com maior aplicação no setor farmacêutico, uma vez que é obtida na indústria com um elevado rendimento e baixo custo (GAVINI, 2011; KRANAWETVOGL et al, 2013). É detentora de uma cavidade interna cujas dimensões são apropriadas para acomodar uma grande variedade de fármacos (TSAI et al, 2010). Sendo assim, a β -CD é a CD presente na maior parte das formulações existentes no mercado (KUMBASAR et al, 2014; ANDRADE et al, 2014).

Estudos de toxicidade mostram que β -CD apresenta baixa toxicidade quando administrada por via oral (LE et al, 2014). Em doses superiores a 600 mg/kg, a β -CD não revelou qualquer efeito adverso no peso corporal, no crescimento, nos valores bioquímicos e hematológicos de ratos e cães, não tendo sido observado também mutagenicidade ou teratogenicidade com doses inferiores a 400 mg/kg. A β -CD quando administrada por via intravenosa e parenteral pode causar nefrotoxicidade grave (LE et al, 2014; YAO et al, 2014) e toxicidade renal (KURKOV & LOFTSSON, 2013).

Após a administração oral, as quantidades absorvidas no duodeno e no intestino delgado são relativamente baixas (1-2 %). A metabolização pelas bactérias processa-se no cólon e cego e pode levar à produção de gases e diarreia. A administração em doses elevadas não é recomendada. A DL_{50} oral observadas em experimentos realizados com ratos foi > 5000 mg/Kg, a DL_{50} intravenosa observada em ratos ficou entre 450 e 790 mg/Kg (MARTIN DEL VALLE, 2004).

Atualmente, vem sendo desenvolvidas técnicas de modificação de CD por reações enzimáticas. Diferentes características podem ser obtidas nestas

modificações, com reações de aminação, esterificação, metilação e eterificação de grupos hidroxilas primárias e secundárias (ZAFAR et al, 2014). Alguns produtos destas reações apresentam baixa atividade hemolítica, alta solubilidade em água e têm encontrado diversas aplicações na área farmacêutica e cosmética (HUI et al, 2011). Diversas propriedades físicas, químicas e biológicas são alteradas com estas modificações (GAO et al, 2013). Por exemplo, complexos de inclusão formados com a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), uma β -CD modificada, mostrou menor toxicidade quando comparada com complexos de inclusão formados com a β -CD natural (ASTRAY et al, 2009; GE et al, 2012; KURKOV & LOFTSSON, 2013).

Recentemente, OGAWA e colaboradores (2013) demonstraram que apesar da β -CD não ser uma boa candidata como excipiente para administração parenteral da quetiapina, um fármaco antipsicótico, os seus derivados como G₁- β -CD, G₂- β -CD, HP- β -CD, DM- β -CD e TM- β -CD promoveram um aumento da solubilidade da substância ativa, bem como um aumento da sua estabilidade.

No trabalho publicado por FREITAS e colaboradores (2012) a complexação com olanzapina, um antipsicótico de alto custo, utilizado no tratamento da esquizofrenia, foi realizada com o intuito de aumentar a disponibilidade do fármaco em meio aquoso e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. Os autores observaram a complexação com diferentes tipos de CDs, determinando que a metil- β -CD foi capaz de aumentar a solubilidade aparente da olanzapina em dez vezes, o que interfere significativamente na dose necessária da droga em uma formulação farmacêutica, diminuindo o custo do produto final (FREITAS et al, 2012).

Diversas pesquisas relacionadas com produtos naturais têm demonstrado o importante papel da β -CD em formar complexos de inclusão, como por exemplo, com o óleo de limão, obtendo resultados significativos na redução da perda por volatilização, fotodegradação e degradação por oxigênio (PADUKKA et al, 2000).

Fernandes e colaboradores (2009) realizaram estudos com o intuito de complexar o óleo essencial da *Lippia sidoides* em β -CD, e observaram resultados importantes na melhora das propriedades físico-químicas dos compostos presentes no óleo, como por exemplo, a proteção frente a oxidação dos compostos fenólicos (CEVALLOS et al, 2010).

O *Hypericum perforatum*, conhecido popularmente como “erva de são joão”, rica em hipericina, é empregado como anti-inflamatório, anti-retroviral, agente

cicatrizante e antidepressivo em alguns países (ZHANG & MA, 2013). Kalogeropoulos e colaboradores (2010) foram os pioneiros a complexar o extrato metanólico desta planta, rica em flavonóides, em β -CD por liofilização. Através dos testes realizados observaram que o complexo de inclusão formado pode proporcionar proteção contra a degradação térmica dos constituintes.

Haidong e colaboradores (2011) evidenciaram que o extrato etanólico do chá verde após a complexação com β -CD apresentou eficiência na calcificação óssea em testes realizados com animais.

Rajendiran e colaboradores (2014) realizaram estudo para investigar a formação de complexos de inclusão de sulfamerazina com α e β -CD e observaram que este fármaco formou complexo mais estáveis com a β -CD devido a sua afinidade e ao tamanho da cavidade desta CD.

Garnero e colaboradores (2014) realizaram estudos com a furosemida e a β -CD onde evidenciaram que após formação do complexo de inclusão ocorreu aumento na solubilidade da furosemida, o que resultou num aumento da biodisponibilidade deste composto após a administração oral.

Yang e colaboradores (2013a) realizaram estudos com naringenina, um produto natural, rico em flavonóide, encontrado em suco de frutas cítricas, que após a formação de complexos de inclusão com a β -CD e seus derivados, puderam evidenciar aumento na solubilidade e estabilidade térmica da naringenina.

Siva e colaboradores (2013) demonstraram que o cloridrato de propafenona forma complexos de inclusão mais estáveis em β -CD quando comparado com os complexos de inclusão formados com α -CD, melhorando as características físico-químicas do fármaco, tais como, biodisponibilidade, solubilidade em água e reduzindo efeitos colaterais.

Estudos realizados por Aguiar e colaboradores (2014) observaram a formação do complexo de inclusão entre o óleo essencial de *C. zehntneri* com β -CD, pelo método de co-precipitação, onde a partir das análises por espectrofotometria no IV e DSC, mostraram o aumento da estabilidade do óleo essencial complexado em comparação ao óleo essencial puro.

Nguyen e colaboradores (2013) realizaram estudos para investigar a formação de complexos de inclusão através do composto natural rutina e β -CD, onde puderam evidenciar uma diminuição significativa na degradação térmica e por radiação UV do

composto durante o armazenamento, e assim conservando a sua atividade biológica.

3.7. Métodos de Formação de Complexos

Complexos com CDs não são facilmente formados, devido as características particulares de cada composto, que devem ser observados para obter complexos de forma mais eficiente. Os métodos mais comumente utilizados para preparação de complexos são:

Co-precipitação: este método é o mais amplamente utilizado em escala laboratorial sendo frequentemente empregado na obtenção de complexos de inclusão cristalinos com a CD.

Esta técnica parte de uma solução contendo o composto estudado e CD em condições muito próximas a saturação e por meio de mudanças bruscas de temperatura ou adição de solventes orgânicos, se obtém a precipitação do material em forma de complexo de inclusão. Os cristais obtidos podem ser coletados por centrifugação ou filtração (MIRO et al, 2000).

A principal desvantagem desse método está na ampliação de escala. O baixo rendimento conseguido em escalas maiores, o risco de formação de complexos de inclusão com solventes orgânicos e o longo tempo do processamento (um a três dias) torna-o pouco atrativo em escala industrial (CHOI et al, 2010; CEVALLOS et al, 2010; MARTÍN et al, 2010).

Suspensão (slurry): neste método, a ciclodextrina e o “hóspede” não estão dissolvidos, mas finamente suspensos em água à temperatura ambiente, com intensa agitação. Geralmente, uma parte de ciclodextrina é misturada com duas partes de água formando uma suspensão. A molécula “hóspede” para ser complexada ou é dissolvida em um solvente adequado ou adicionada diretamente (sem uso de solvente) à suspensão de ciclodextrina (MACEDO, 2010; FERNANDES et al, 2009).

Este método é o mais viável para propósitos industriais, pois a quantidade de água utilizada é pequena e o equipamento exigido é de uso convencional, ou seja, raramente necessita de qualquer investimento adicional, sendo que a pasta obtida

pode também ser facilmente seca por *spray dryer* ou liofilização (MARTÍN et al, 2010; PANDIT et al, 2011).

Malaxagem (kneading): este método é aplicável a compostos ativos fracamente solúveis em água. Consiste em formar uma pasta a partir da adição de pequenas quantidades de líquido (água ou etanol/água) suficiente para umedecer a mistura em pó do composto e a CD. Em escala laboratorial é realizada em um almofariz com auxílio de um pistilo. Industrialmente, a mistura de componentes é efetuada em uma malaxadora. A secagem do material pode ser feita em dessecador ou diretamente na malaxadora, acompanhada de pulverização para uniformizar o tamanho de partícula (ALVES et al, 2012).

Devido à simplicidade, o elevado rendimento e à facilidade de transposição de escala, este método é um dos mais utilizados na indústria farmacêutica, ainda que sua eficiência de complexação seja inferior quando comparada com outras técnicas. A lavagem com solvente orgânico pode tornar o processo inadequado, devido a quantidade utilizada destes solventes, obtendo complexos tóxicos (GRANDELLI et al, 2012).

Mistura Física: alguns compostos podem ser complexados pela simples mistura mecânica com a CD. A mistura física é mais adequada a óleos ou outros compostos na forma líquida. O tempo de mistura exigido é variável e depende do composto de interesse. Geralmente, pode ser realizado à temperatura ambiente e é uma variação do método de malaxagem (LIN et al, 2012).

Este método baseia-se na simples mistura dos componentes sem adição de água. Em alguns casos são necessários vários dias para detectar-se a formação de complexos de inclusão. Em geral, é um método de complexação pouco eficiente, restrito a princípios ativos líquidos e óleos essenciais, que atuam como solvente, propiciando a formação de complexos (HEDGES, 1998; PEREIRA LOPES, 2011).

Spray dryer: representa um dos métodos mais empregados para produzir complexos de inclusão a partir de uma solução. A mistura parcial do sistema e a rápida eliminação de água propiciam uma eficiência de complexação elevada. Além disso, esta técnica permite controlar o tamanho das partículas obtidas em intervalos

bastante estreitos. O baixo rendimento e o estresse térmico são algumas das limitações desta técnica (PANDIT et al, 2011; SOUZA et al, 2013).

Liofilização: consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução, por meio de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Geralmente se obtêm pós secos, amorfos e com elevado grau de interação hóspede-CD. Apresenta como desvantagens, o longo tempo de processamento e as más características de fluxo do material obtido (KALOGEROPOULOS et al, 2010; GRANDELLI et al, 2012; SOUZA et al, 2013).

Fluidização supercrítica: constitui um dos métodos mais inovadores de obtenção de complexos em estado sólido. O desenho das partículas empregando CO₂ em estado supercrítico confere aos materiais obtidos por esta técnica, características únicas quanto à interação (SEKHON, 2010). Apesar de ser um método atóxico (não utiliza solventes orgânicos), rápido, quimicamente estável (utiliza temperaturas moderadas), de baixo custo de manutenção e com promissores resultados descritos na literatura, ainda é uma técnica experimental e que apresenta um custo inicial bastante elevado (GRANDELLI et al, 2012; CAPUTO et al, 2013).

A seleção do método de preparo de complexos de inclusão com ciclodextrinas tem que ser realizada com bastante cautela. Há a necessidade de conhecer muito bem o tipo de complexo pretendido para que o processo mais adequado seja utilizado e a maior eficiência de complexação seja atingida.

3.8. Técnicas utilizadas na caracterização dos complexos de inclusão

Para avaliar a formação dos complexos de inclusão com CDs, pode-se destacar algumas técnicas bastante utilizadas, como a análise térmica, principalmente a calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), além das técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS), difração de raios X (DRX), espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), entre outras (RAJENDIRAN et al, 2014(1)).

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC): é uma das primeiras técnicas a ser considerada por ser relativamente simples e demandar pouco tempo de análise (SOUZA, 2008; CEVALLOS et al, 2010). As curvas DSC das CDs podem ser visualizadas de formas características, por apresentarem eventos endotérmicos que correspondem à sua desidratação, mudança de fase cristalina, fusão e decomposição. Assim, por exemplo, a α -CD apresenta dois ou três eventos, de desidratação dependendo da forma cristalina que se encontra, já a β -CD e a γ -CD apresentam um pico largo entre 90 °C e 120 °C (RAJENDIRAN et al, 2014(2)).

A análise da formação de complexos pode ser feita comparando-se a curva DSC do complexo da CD, do composto puro e dos complexos preparados utilizando os métodos selecionados. A curva da mistura física, que geralmente apresenta pequena capacidade de formação de complexos, mostra-se como a soma dos eventos característicos da CD e do composto em questão. Quando ocorre a formação do complexo, observam-se mudanças do perfil termoanalítico e muitas vezes reduções ou ausências de eventos devido à perda da estrutura cristalina causada pela complexação, a exemplo, o pico de fusão do fármaco (GRANDELLI et al, 2012; RAJENDIRAN et al, 2014(2)). Além disso, o evento característico da desidratação da CD na curva DSC de complexos podem apresentar deslocamentos devido a substituição das moléculas de água na cavidade pelo composto estudado.

Termogravimetria e Termogravimetria derivada (TG/DTG): esta técnica fornece dados quantitativos de perda de massa com o aumento da temperatura. No caso das CDs os principais eventos observados são a perda de água (em torno de 100°C) e a decomposição (em torno de 250°C). Desta forma, a técnica de TG/DTG pode contribuir para avaliar a formação de complexos a partir de mudanças dos eventos de desidratação, volatilização, decomposição e oxidação (FERNANDES et al, 2009).

Além das aplicações convencionais, diversos estudos vêm sendo publicados a partir da aplicação de técnicas termoanalíticas com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos de reações como desidratação, volatilização e decomposição (HUAN et al, 2001; CIDES et al, 2006; FELIX et al, 2009). As técnicas termoanalíticas podem ser utilizadas para a realização de estudos de reações com o

intuito de se determinar parâmetros cinéticos, como por exemplo energia de ativação (E_a), ordem da reação e o fator pré-exponencial ou fator frequência (A) (OLIVEIRA et al, 2005; FELIX et al, 2009). Através destes parâmetros é possível mensurar a variação de uma amostra quando esta é aquecida (estudo cinético dinâmico) ou mantida a temperatura constante (estudo cinético isotérmico). Para a realização do estudo cinético isotérmico as amostras são submetidas a temperaturas constantes, enquanto que para o estudo não-isotérmico, os métodos envolvem o aquecimento das amostras sob diferentes razões de aquecimento (OZAWA, 1965; CHENG et al, 2001; FELIX et al, 2009).

O método convencional para estudo isotérmico utiliza a equação de Arrhenius para determinar parâmetros cinéticos. Os métodos isotérmicos exibem limitações experimentais, por exemplo, quando se utilizam temperaturas de isoterma relativamente altas em longos períodos é possível que a temperatura varie durante o ensaio, comprometendo as medidas de tempo. Outra fonte de erros comum é que nem sempre é possível o aquecimento até a temperatura de isoterma sem que o mesmo provoque o início do evento. Já nos métodos não-Arrhenianos pode-se destacar o tratamento de dados simplificados, que não exige premissas a respeito do mecanismo da reação. Embora existam imprecisões nos resultados, intrínsecas à aproximação de que as reações no estado sólido ocorrem em uma única etapa, os valores obtidos a partir destes métodos apresentam em geral maior concordância com o comportamento verificado empiricamente (SIMON et al, 2008).

Para o estudo cinético não-isotérmico ou dinâmico, o método descrito por Ozawa, é muito empregado e também permite determinar tais parâmetros (OZAWA, 1965; FELIX et al, 2009). A comparação entre os métodos isotérmicos e dinâmicos tem sido amplamente discutida por diversos autores (YOSHIDA, 1993; OZAWA, 2000; HUANG et al, 2001; CIDES et al, 2006; FELIX et al, 2009). De forma geral estes estudos têm mostrado que para análise completa da cinética de reações químicas de decomposição é recomendável a utilização dos dois métodos.

O método integral sugerido por Ozawa é, ultimamente, o mais utilizado, devido à popularização dos softwares comercializados pelas empresas fabricantes de analisadores térmicos. Neste método, a estimativa do tempo necessário para a degradação requer o conhecimento de outros parâmetros cinéticos: a ordem da reação (n) e o fator pré-exponencial (A) da equação de Arrhenius. A estimativa de n

é realizada iterativamente, testando a correlação entre o tempo reduzido (Θ) e $g(\alpha)$ que é o logaritmo de α (fração decomposta) de acordo com n , em uma razão de aquecimento (β) determinada (OZAWA, 1970).

No século XIX foram propostas outras funções para expressar a dependência da temperatura com a constante de velocidade $k(T)$. Dentre elas, as mais adequadas para tratamento dos dados experimentais, foram as equações descritas a seguir (SIMON, 2008) (Equação 1 e 2):

$$k(T) = A_k T^m \quad (\text{Equação 1})$$

$$k(T) = A_k e^{DT} \quad (\text{Equação 2})$$

onde A_k , m (massa) e D (constante) são parâmetros ajustáveis.

Do mesmo modo que os métodos Arrhenianos, nos métodos não-Arrhenianos o valor de $f(\alpha)$ é considerado constante em uma dada α e $k(T)$ é função apenas da temperatura.

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): é uma técnica relevante na análise de substâncias orgânicas. O estudo da matéria é realizada pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um Espectrômetro de Massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas. O complexo é introduzido no equipamento, passa por uma fonte de íon, na qual é produzido um feixe de partículas provenientes da amostra, posteriormente a amostra passa por um analisador que separa as partículas de acordo com a massa e o detector irá caracterizar as amostras, permitindo assim a análise individual de cada um dos compostos (WU & VOGT, 2012; SCHURIG, 2010; MARRETO et al, 2008).

Difração de raios X (DRX) - a técnica de DRX mede a intensidade de raios X difratados por uma amostra sólida sobre diferentes ângulos. Algumas CDs, no seu estado cristalino formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares as quais estabilizam tanto a conformação da molécula, como também a sua estrutura cristalina gerando difratogramas com picos bem definidos (RAOOV et al, 2014).

A DRX pode ser empregada para avaliação dos complexos de inclusão devido aos padrões de difração destes quando comparados aos componentes individuais.

O emprego desta técnica se baseia na comparação dos difratogramas das substâncias puras e do complexo. A observação de um difratograma com características de material amorfo, sem picos bem definidos, pode ser indicativo da ocorrência de complexação (RAJENDIRAN et al, 2014(2)).

Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR): a espectrofotometria no infravermelho mede a excitação vibracional dos átomos envolvidos em uma ligação química. As posições das linhas de absorção no espectro de infravermelho dependem do tipo de grupo funcional presente. Cada grupo funcional ligado a diferentes átomos possui uma banda diferente no espectro. Esta técnica é útil na determinação da composição porque permite identificar os diferentes grupos funcionais de uma determinada amostra e suas ligações (FERNANDES et al, 2009).

A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho se estende de aproximadamente 0,75 μm até quase 1 mm, mas o segmento mais frequentemente utilizado pela indústria farmacêutica está situada entre 2,5 e 25 μm (4000 a 400 cm^{-1}), conhecido como região fundamental ou infravermelho médio (DRUY, 2004). O espectro no infravermelho de uma substância é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, portanto, por meio das bandas dos grupos funcionais, essa técnica é capaz de identificar compostos. Além disso, pode ser utilizada na análise quantitativa de misturas de compostos através da intensidade da banda característica de um composto da amostra (LOPES & FASCIO, 2004).

As técnicas de FTIR são bastante utilizadas na caracterização de sistemas sólidos com CDs, por serem determinações rápidas e precisas. A natureza dos fenômenos envolvidos na complexação torna as mudanças de intensidade e deslocamentos das bandas correspondentes aos grupos químicos do fármaco ou da ciclodextrina bastante sutis, requerendo uma cuidadosa interpretação dos resultados (LYRA et al, 2010). A formação dos complexos de inclusão em fase sólida pode ser avaliada pela comparação de espectros no infravermelho do fármaco puro e dos complexos sólidos obtidos por diferentes métodos de preparação. Para isso, são verificadas interações em nível molecular, detectando as mudanças significativas na forma e na posição das faixas de absorbância (LYRA et al, 2010).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): a microscopia eletrônica de varredura é uma técnica utilizada para definir qualitativamente a formação dos complexos de inclusão (FERNANDES et al, 2009). Esta técnica fornece informações morfológicas sobre a superfície de sólidos, além de possibilitar informações sobre possíveis contaminação (LYRA et al, 2010). A profundidade do feixe eletrônico não ultrapassa algumas dezenas de nanômetros. A imagem obtida tem um forte contraste topográfico apresentando o relevo da amostra com um aspeto semelhante ao que teria a observação visual direta ou com uma lupa caso isso fosse possível (TAKAHASHI, 2009).

Docking: o processo de ancoramento molecular (*docking*) envolve o conhecimento prévio da conformação do ligante ou hóspede e sua orientação no sítio de interação com o hospedeiro (CIOBANU et al, 2012). Estudos de interação computacional entre compostos são de fundamental importância para entender o mecanismo de associação, o posicionamento tridimensional e a energia de interação. Entre as técnicas de avaliação da conformação estrutural mais confiáveis destaca-se a difração de raios X de monocristais e o RMN. Além destes, o *docking* é uma das técnicas mais importantes na investigação de interação moleculares nos casos em que a estrutura 3D dos compostos já foi elucidada. Esse tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo hóspede-hospedeiro além de calcular a parâmetros de estabilidade relativa (HUANG, 2014; SERIDI et al, 2011).

Material e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para a preparação dos complexos no presente trabalho foi utilizado o limoneno (96%), α -ciclodextrina (98%, cód. MKBC3299) e β -ciclodextrina (97%, cód. MKBC3299) adquiridos da Sigma-Aldrich (USA).

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção e preparação dos complexos de inclusão com limoneno (CIL)

Os complexos de inclusão foram preparados por três diferentes métodos de acordo com MARRETO et al, 2008.

4.2.1.1 - Complexação por mistura física: a mistura mecânica foi preparada pela adição do limoneno em um almofariz contendo CD, pulverizado manualmente, na razão molar 1:1 (CD:LIM), ou seja, foram utilizados 0,972 g da α -CD para 0,136 g do limoneno, e outra preparação contendo 1,135 g da β -CD para 0,136 g do limoneno. Em seguida a mistura física foi armazenada em recipientes de vidro hermeticamente fechados.

4.2.1.2 - Complexação por malaxagem: a complexação por malaxagem ou método da pasta foi realizada por meio da homogeneização da CD com 20 mL de água, diretamente no recipiente, suficiente para formação de uma pasta. Em seguida foi feita a adição do limoneno na razão molar 1:1 (CD:LIM), ou seja, 0,972 g da α -CD para 0,136 g do limoneno, e 1,135 g da β -CD para 0,136 g do limoneno. Esse material foi agitado sob condições manuais e posteriormente armazenado em dessecador até a formação de uma película transparente, a qual foi removida por trituração manual e armazenada em recipiente de vidro hermeticamente fechado.

4.2.1.3 - Complexação por co-evaporação: esse método foi feito pela adição de água a um bécker contendo CD e limoneno na proporção 1:1 (CD:LIM), ou seja, 0,972 g da α -CD para 0,136 g de limoneno, e 1,135 g da β -CD para 0,136 g de limoneno. A mistura foi submetida à agitação magnética em 400 rpm, por 36 horas.

Posteriormente a amostra foi transferida para um recipiente e seca em um dessecador.

4.2.2. Caracterização físico-química dos complexos de inclusão (CI)

4.2.2.1 - Extração do limoneno total dos CI

Cerca de 200 mg de cada amostra dos CIL preparados foram colocados em tubos de vidro contendo 8,0 mL de água e 4,0 mL de hexano, e posteriormente foram mantidos em banho-maria a 85 °C por 20 min. Em seguida, a fase orgânica foi retirada e o procedimento foi repetido três vezes. As fases orgânicas das lavagens consecutivas foram reunidas e 1,0 mL de hexano e 2,0 mg do mentol (padrão interno) foram adicionados. O material obtido foi concentrado para aproximadamente 1,0 mL usando um evaporador rotativo e armazenado em frascos a cerca de 4 °C até a análise por CG/EM (PADUKKA et al, 2000). O limoneno total corresponde à soma do hóspede da cavidade da CD mais o adsorvido na superfície. A solução padrão do limoneno foi preparada por dissolução de 20 mg do limoneno em 1,0 mL de hexano. O cariofileno (padrão interno) foi adicionado a essa solução antes da análise por CG.

4.2.2.2 – Extração do limoneno adsorvido na superfície da CD

Para extração dos compostos voláteis adsorvidos na superfície da CD, 3,0 g do pó foram lavados com 20 mL de hexano sob agitação de 20 min. A suspensão foi então filtrada e o resíduo lavado novamente com 10 mL de hexano. Em seguida, 1,0 mL de hexano e 2,0 mg do mentol (padrão interno) foram adicionados ao material obtido, que posteriormente foi concentrado e armazenado como já descrito. A diferença entre o limoneno total e o limoneno adsorvido na superfície foi o montante do limoneno complexado na cavidade da α -CD ou da β -CD, e foi utilizado para determinar a razão de inclusão do composto.

4.2.3. Análises

4.2.3.1 - Térmica

Os complexos obtidos foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG). As curvas DSC e TG/DTG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 900 °C, utilizando-se equipamento Shimadzu DSC-60 e TGA-60, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10 °C/min, cápsula de alumínio contendo aproximadamente 1,0 ± 0,2 mg de amostra. Os equipamentos foram previamente calibrados e/ou verificados no eixo da temperatura utilizando padrão de oxalato de cálcio com pureza de 99,99%, no caso da TG, e índio metálico com pureza de 99,99% para o DSC. Todas as análises foram realizada em duplicata.

4.2.3.2 - Estudo cinético da primeira etapa de decomposição

Para determinação da energia de ativação, fator frequência e ordem da reação, foram obtidas as curvas termogravimétricas em diferentes razões de aquecimento das ciclodextrinas puras, das misturas físicas e dos complexos obtidos pelos métodos da malaxagem e co-evaporação. Essas análises foram realizadas na faixa de temperatura entre 25 e 350°C, em atmosfera de nitrogênio (100 mL.min⁻¹) e porta amostra de alumínio, utilizando-se termobalança modelo TGA-60 da marca Shimadzu®. As razões de aquecimento adotadas no estudo cinético não-isotérmico foram 2,5 - 5,0 - 10 e 15°C.min⁻¹. Antes dos ensaios verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monohidratado conforme norma ASTM (1582 – 93).

4.2.3.3 - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

A análise dos complexos contendo limoneno foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG-EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 de 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm de CIL, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min, a temperatura foi

programada mantendo 50 °C por 1,5 min, seguido de um aumento de 4 °C/min até atingir 200 °C, depois a 10 °C até atingir 250 °C mantendo constante esta temperatura por 5 min.; temperatura do injetor de 250 °C e temperatura do detector (ou interface) de 280 °C; foi injetado um volume de 0,5 µL em acetato de etila; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 64.20 kPa. As condições do EM foram detector de íons do tipo quadrupolo operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

4.2.3.4 - Difração de Raios X (DRX)

As difrações de raios X dos complexos foram obtidas em equipamento modelo D5000, com tubos de CuK_α, no intervalo de 3 a 65° (2θ) e 1s a cada passo, utilizando o método do pó.

4.2.3.5 - Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no comprimento de onda de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, em pastilhas de KBr, utilizando equipamento FTIR-SHIMADZU modelo IRTracer-100, em temperatura ambiente.

4.2.3.6 – Modelagem Molecular (*Docking*)

A análise de ancoramento molecular (*docking*) foi realizada utilizando o programa Hyperchem versão 8.0 (GAINESVILLE, 2009). As estruturas químicas dos compostos (limoneno e ciclodextrinas) foram desenhadas, e suas geometrias foram otimizadas utilizando o método MM+ (Modelagem Molecular) (ALLINGER, 1977). Posteriormente, foi realizada uma nova otimização da geometria baseada no método semi-empírico AM1 (Austin Modelo 1) (DEWAR et al, 1985). As estruturas otimizadas foram submetidas a análise conformacional pelo método de busca aleatória (COHEN, 1996; LEACH, 2001) com 1.000 interações, 100 ciclos de

otimização, e 10 confôrmeros de menor energia mínima. Os diedros selecionados foram avaliados por rotação em conformidade com as condições a norma do programa (padrão do programa - *default*), em que o número de variações simultâneas é de 1 a 8, as cadeias acíclicas foram submetida a rotações de 60 a 180° e as torções de anel de 30 a 120°. Os confôrmeros de menor energia mínima foram selecionados, salvos como arquivos.mol e exportados para o programa Molegro Molecular Viewer 2.5 (MOLEGRO, 2013). O hóspede e o hospedeiro foram preparados no VEJA ZZ (PEDRETTI et al, 2004). No AutodockWizard (WOLF, 2009; HAMPELE et al, 1997) do programa PyRx-*Virtual Screening Tool* foi realizado a análise de *docking*. O parâmetro selecionado foi Lamarckiano e 10 confôrmeros de menor energia para cada ligante. A interpretação foi realizada no programa Molegro Molecular.

4.2.2.2.7 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os complexos de inclusão com LIM foram montados em stubs de alumínio, revestido com uma fina camada de ouro e visualizados com um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOLJSM-6360-LV, a uma tensão de aceleração de 10 kV.

Resultados e Discussão

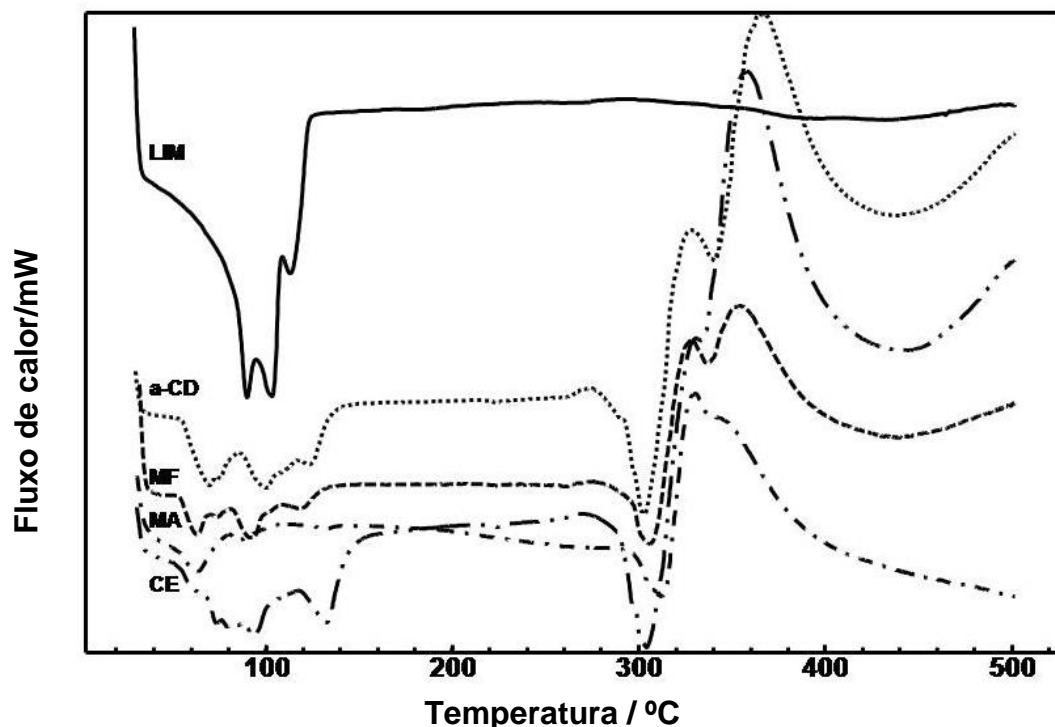
5. Resultados e Discussão

5.1. Análise Térmica

Na Figura 6 é apresentada a curva DSC do limoneno, onde podem-se observar eventos endotérmicos pronunciados característicos da volatilização do óleo na faixa de temperatura de 32-128 °C. Na mesma figura pode-se observar a curva da α -CD, onde são visualizados três eventos endotérmicos subsequentes na faixa de 52-138 °C que correspondem à perda de água. Além disso, na faixa de 274-328 °C ocorre um evento também endotérmico característico da fusão da α -CD seguido de decomposição. Os eventos acima de 337 °C correspondem as etapas de decomposição da mesma.

A curva DSC da MF (Figura 6) mostra que esse método é pouco eficiente para a formação de complexos com o limoneno, uma vez que apresenta um perfil endotérmico semelhante ao da α -CD. Já a curva DSC do complexo preparado pelo método MA mostra apenas um evento endotérmico na faixa de temperatura de 32-78 °C, que corresponde a perda de água e limoneno adsorvido a superfície. É possível observar também que para o MA ocorreu um deslocamento do evento característico da fusão para temperaturas menores. Geralmente, deslocamentos desse pico estão associados a interações entre as moléculas. Os eventos acima de 328 °C correspondem a decomposição da CD. A curva DSC do complexo obtido pelo método CE mostra três eventos endotérmicos característicos da perda de água e óleo incorporado a superfície. No entanto, mostra um perfil diferente daquele observado para α -CD pura e para a MF. Além disso, observa-se da mesma forma que para o MA um deslocamento da fusão do complexo para temperaturas menores (Figura 6).

Figura 6. Curvas DSC do Limoneno (LIM), α -CD, MF, MA, CE obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 ($100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

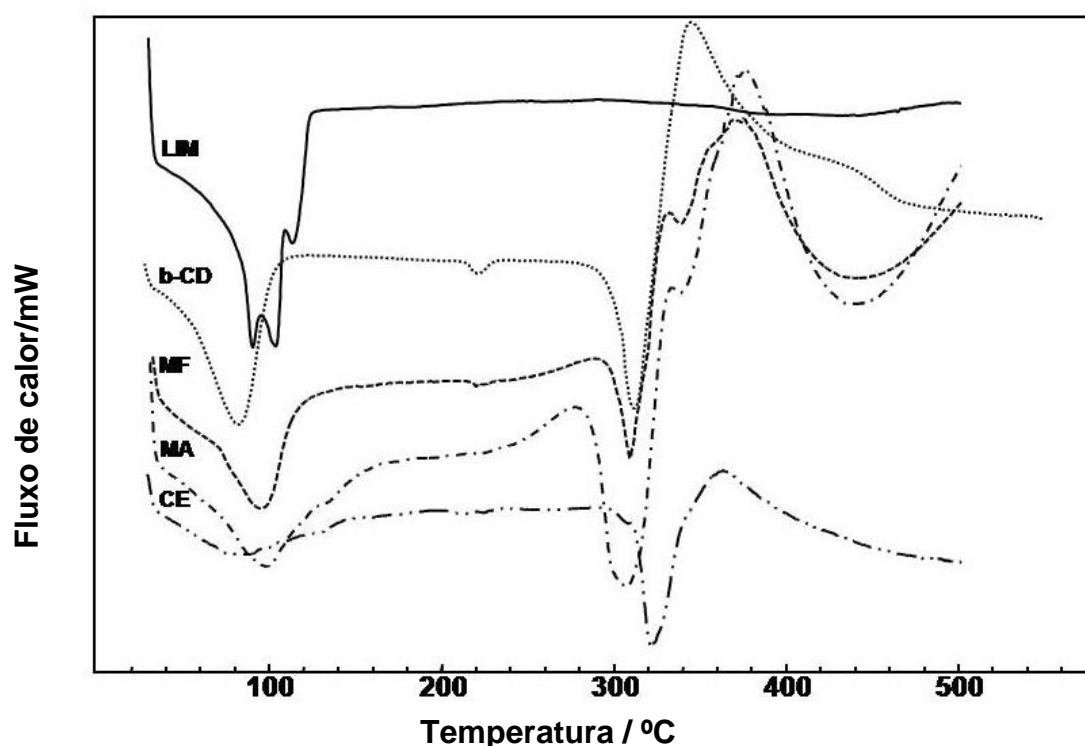


A curva DSC da β -CD apresenta um evento endotérmico característico na faixa de temperatura de 30 - 116°C que corresponde a liberação de água presente na sua estrutura molecular (Figura 7). Na faixa de 210 - 230°C pode-se observar uma transição de fase cristalina, evento característico da molécula e já relatado em alguns estudos anteriores (MENEZES et al, 2014). Após esse evento, observa-se um pico endotérmico pronunciado na faixa de 278 - 345°C correspondente a fusão com decomposição. Os eventos acima de 345°C correspondem a decomposição da β -CD.

De acordo com a Figura 7 pode-se observar que a MF e a MA apresentaram um evento endotérmico semelhante a β -CD pura na faixa de temperatura de 33 - 181°C , esse evento corresponde a perda de moléculas de água, e possivelmente a volatilização do limoneno adsorvido a superfície da CD. O evento endotérmico observado no método de MF na faixa de temperatura de 288 - 318°C corresponde a fusão do complexo. Os eventos acima de 320°C podem ser atribuídos a decomposição. Da mesma forma que os complexos obtidos para α -CD é possível

observar um deslocamento da temperatura de fusão dos complexos quando comparados a β -CD pura. Já a curva DSC do complexo obtido pelo método CE apresentou uma redução da entalpia do evento referente a perda de água, mostrando um evento endotérmico menos pronunciados quando comparado ao método MA, o que é um indicativo da menor quantidade de água do complexo CE e uma possível substituição pelas moléculas do limoneno.

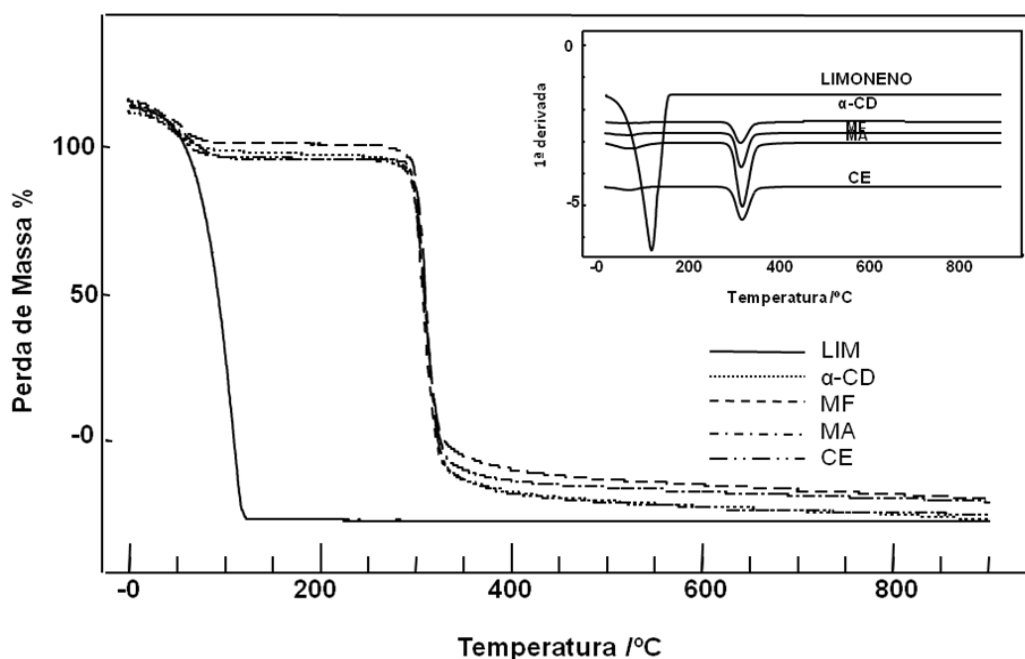
Figura 7. Curvas DSC do Limoneno (LIM), β -CD, MF, MA, CE obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 ($100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.



Na Figura 8 é apresentada a curva TG/DTG do limoneno onde pode-se observar uma perda de massa em torno de 100% no intervalo de 30-169 °C, o que corrobora os resultados por DSC. A curva TG/DTG da α -CD mostrou duas etapas de perdas de massa, seguidas de decomposição e eliminação do material carbonáceo. A primeira e segunda etapas (entre 25-120°C) somam 10,7% de perda de massa e corresponde a eliminação de água da α -CD. A terceira etapa ($\Delta m = 75,6 \%$ / 270-350 °C) mostra a decomposição seguida de carbonização, como também relatado no estudo realizado por KAYACI et al, 2013.

De acordo com a Figura 8 pode-se observar que o perfil termoanalítico dos complexos obtidos pelo método da MF, MA e CE foram semelhantes a α -CD. No entanto, as perdas de massa atribuídas entre 120 e 278°C foram um pouco superiores para o complexo MA e CE o que sugere uma maior eficiência de complexação por esses métodos (Tabela 1). Isto acontece pois a primeira perda de massa geralmente ocorre entre 25-120°C onde observa-se a perda de água e óleo adsorvido a superfície. Entre 120 e 278°C observa-se de fato perdas de massa características do material incorporado a cavidade das CDs, uma vez que nessa faixa de temperatura as CDs apresentam estabilidade térmica. O fato de estar complexado ao hospedeiro faz com que o material precise de uma temperatura maior para volatilizar, quando comparado por exemplo a MF.

Figura 8. Curvas TG/DTG do Limoneno, α -CD (α -Ciclodextrina), MF (Mistura Física), MA (Malaxagem) e CE (Co-Evaporado) obtidas em atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.



Na Figura 9 é apresentada as curvas TG/DTG da β -CD, MF, MA e CE que apresentaram um perfil termoanalítico similar aos complexos obtidos com a α -CD. Após a avaliação das perdas de massa descritas na Tabela 2 pode-se verificar

valores em torno de 8% para o MA e CE na faixa de temperatura entre 120 e 270 °C, o que é um indicativo da maior capacidade de complexação do limoneno.

Figura 9. Curvas TG/DTG do Lim (Limoneno), β -CD (β -Ciclodextrina), MF (Mistura Física), MA (Malaxagem) e CE (Co-Evaporado) obtidas em atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

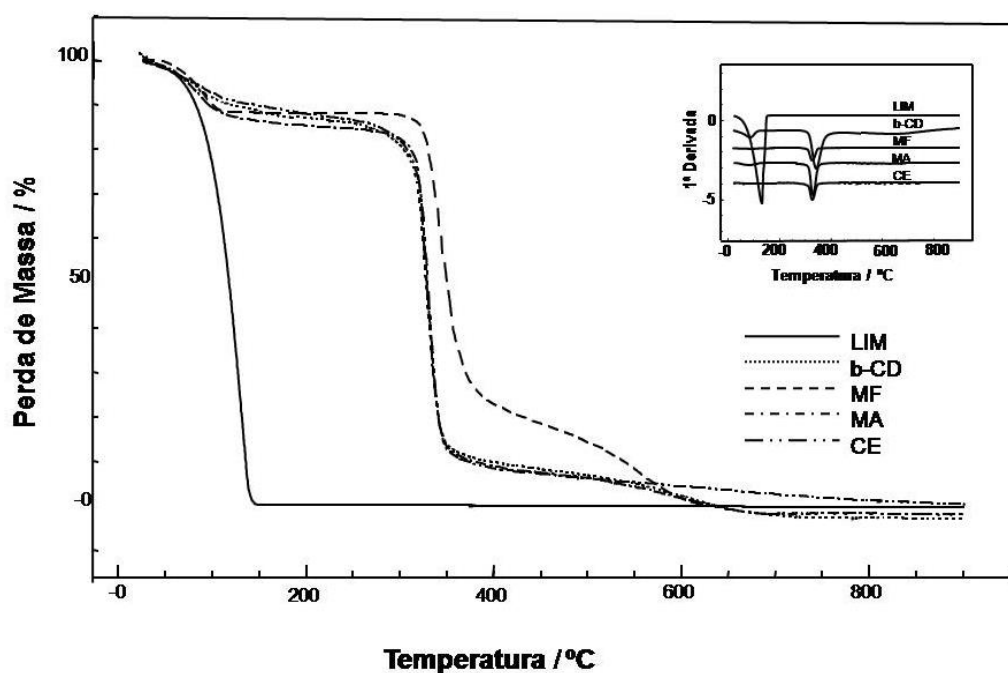


Tabela 1: Percentuais de perdas de massa do limoneno (LIM), α -ciclodextrina (α -CD), mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) obtidos por termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG).

	Perda de massa/%			
	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa	4ª etapa
Limoneno	100 [#]	-	-	-
α -CD	10,7 \pm 1,4 [*]	0,8 \pm 0,1 ⁺⁺	75,6 ^{**}	11,9 ^{***}
MF	10,1 \pm 1,5 ⁺	1,8 \pm 0,6 ⁺⁺	72,6 ^{**}	12,8 ^{***}
MA	11,7 \pm 0,1 ⁺	2,5 \pm 0,5 ⁺⁺	72,7 ^{**}	9,9 ^{***}
CE	10,6 \pm 0,5 ⁺	2,3 \pm 0,5 ⁺⁺	74,7 ^{**}	10,7 ^{***}

[#] Percentual de limoneno evaporado até 149 °C ^{*}percentual de água liberado até 127 °C;
⁺perda de massa relacionada a liberação do limoneno e eliminação de água até 127 °C;
⁺⁺perda de massa provavelmente atribuída a liberação de limoneno no intervalo de 120-270 °C;
^{**}decomposição térmica no intervalo de 350 °C a 900 °C e ^{***}formação de carbono elementar das amostras.

Tabela 2: Percentuais de perdas de massa do limoneno (LIM), β -ciclodextrina (β -CD), mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) obtidos por termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG).

	Perda de massa/%			
	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa	4ª etapa
Limoneno	100 [#]	-	-	
β -CD	11,7 \pm 0,4 [*]	0,3 \pm 0,3 ⁺⁺	37,8 ^{**}	50,5 ^{***}
MF	12,5 \pm 1,3 ⁺	1,4 \pm 0,6 ⁺⁺	70,9 ^{**}	16,9 ^{***}
MA	10,5 \pm 2,3 ⁺	8,0 \pm 1,3 ⁺⁺	70,6 ^{**}	15,4 ^{***}
CE	9,6 \pm 1,4 ⁺	8,3 \pm 1,1 ⁺⁺	72,8 ^{**}	12,4 ^{***}

[#]Percentual de limoneno evaporado até 149 °C ^{*}percentual de água liberado até 120 °C;

⁺perda de massa relacionada a liberação do limoneno e eliminação de água até 120 °C;

⁺⁺perda de massa provavelmente atribuída a liberação de limoneno encapsulado de 120 a 270°C; ^{**}decomposição térmica no intervalo de 270 a 350 °C e ^{***}formação de carbono elementar das amostras de 350 a 900 °C.

Vale destacar como limitação da técnica de termogravimetria, para análises de complexos de inclusão, o fato da mesma não diferenciar as etapas de perda de voláteis e de água, uma vez que essas na maioria das vezes acontecem na mesma faixa de temperatura. Desta forma, para os complexos formados a soma dos percentuais de perda de massa da primeira etapa (25-120°C, que está associada a perda de água+óleo) e da segunda etapa (120-270°C, que está associada ao óleo) são indicativos da eficiência de complexação.

5.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

A análise por CG/EM foi realizada com a finalidade de determinar os teores de limoneno adsorvido a superfície e limoneno na cavidade das ciclodextrinas. Os cromatogramas do teor de óleo de limoneno total das amostras obtidas pelo método da co-evaporação e malaxagem para os complexos de limoneno com α e β -CD são mostrados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10. Cromatograma do óleo total das amostras obtidas por mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) para os complexos de α -CD com limoneno.

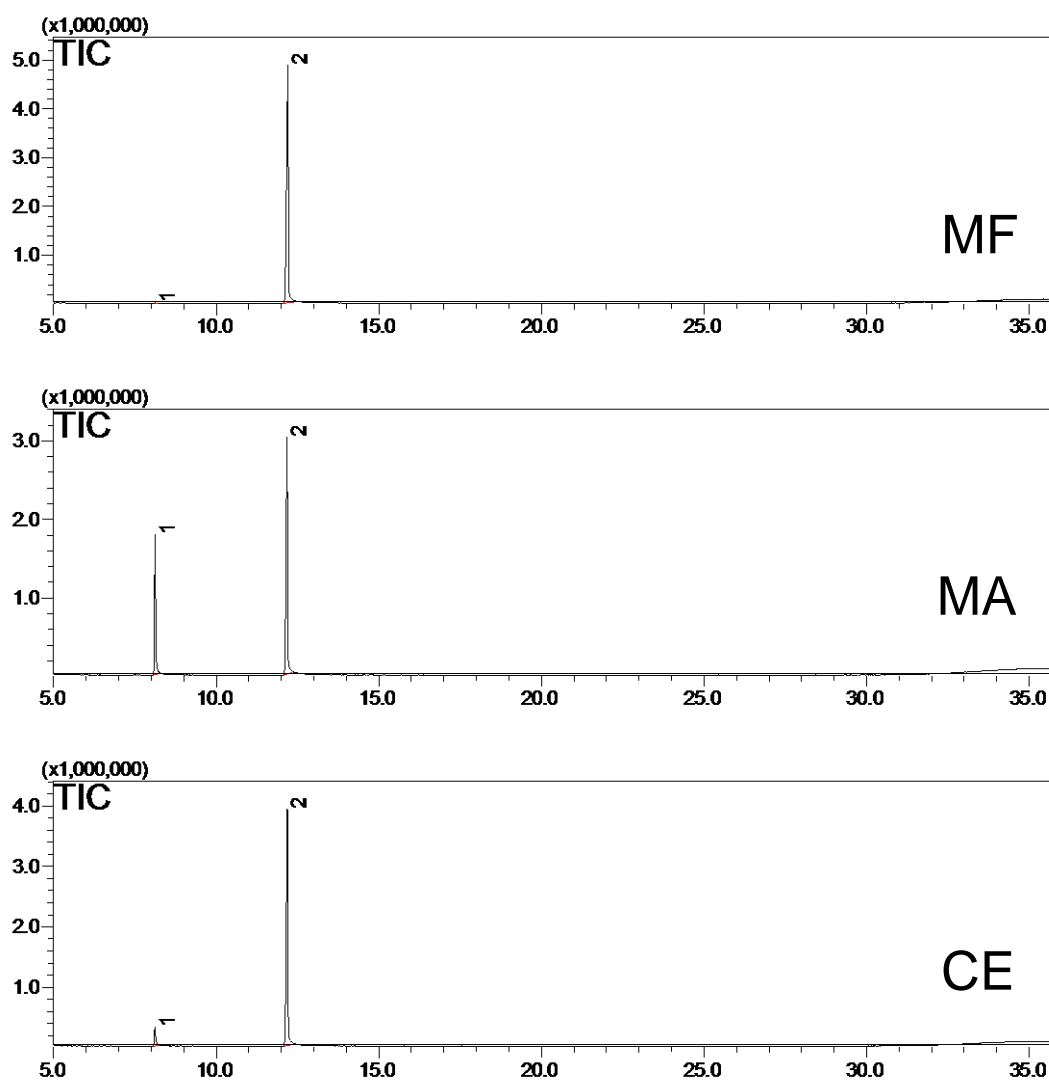
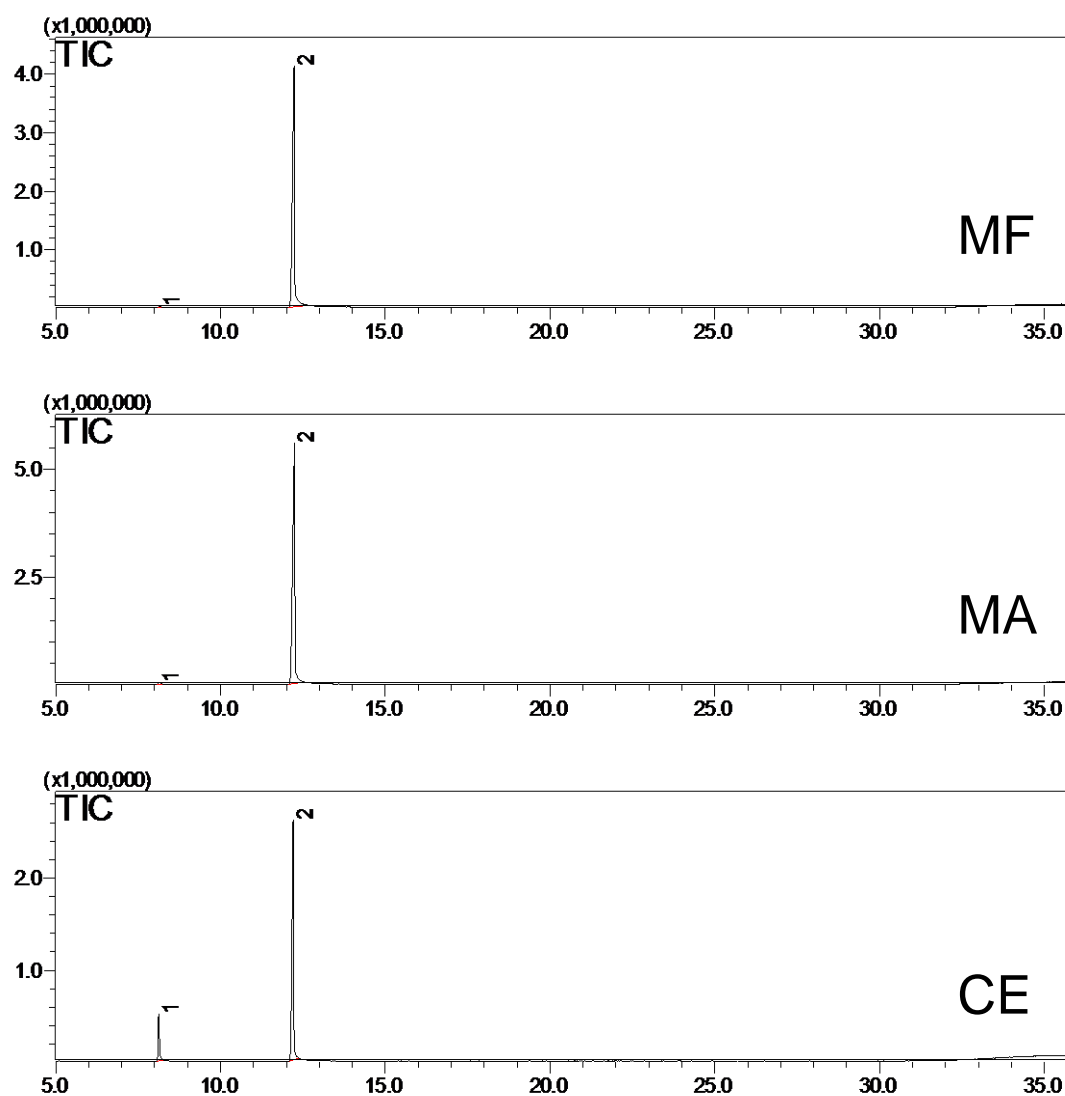


Figura 11. Cromatograma do óleo total das amostras obtidas por mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) para os complexos de β -CD com limoneno.



Nas Tabelas 3 e 4 estão descritas as razões de complexação do limoneno em α e β -CD, respectivamente. A partir da análise por CG pode-se observar que o método da MF tanto para α quanto para a β -CD não foi eficiente para formar complexos de inclusão. Essas amostras apresentaram baixos valores percentuais nas extrações superficiais e totais. Na Tabela 3 está descrita a comparação entre a eficiência de complexação para os três métodos de preparação. De acordo com essa Tabela pode-se observar que para cada limoneno adsorvido a superfície pelo método MA obteve-se 0,49 complexado (1:0,49, limoneno: limoneno/ α -CD). Resultado mais satisfatório foi obtido para a amostra CE 1:18,11 (limoneno: limoneno/ α -CD).

Tabela 3. Determinação das razões de complexação pelos métodos da mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) em α -ciclodextrina (α -CD).

Amostra	Extrações		Conc. % diferença das extrações do limoneno	
	Superficial	Total	Limoneno Compl.	Complexação
MF	0,86	0,20	-0,66	Nenhuma
MA	25,46	37,65	12,19	1:0,49
CE	0,44	8,41	7,97	1:18,11

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 pode-se observar que β -CD não formou complexação na MF e MA observado pela cromatografia gasosa. Já a CE demonstra eficiência de complexação igual a 1:1,44 (limoneno: limoneno/ α -CD), sendo assim considerado por esta técnica o melhor método de complexação.

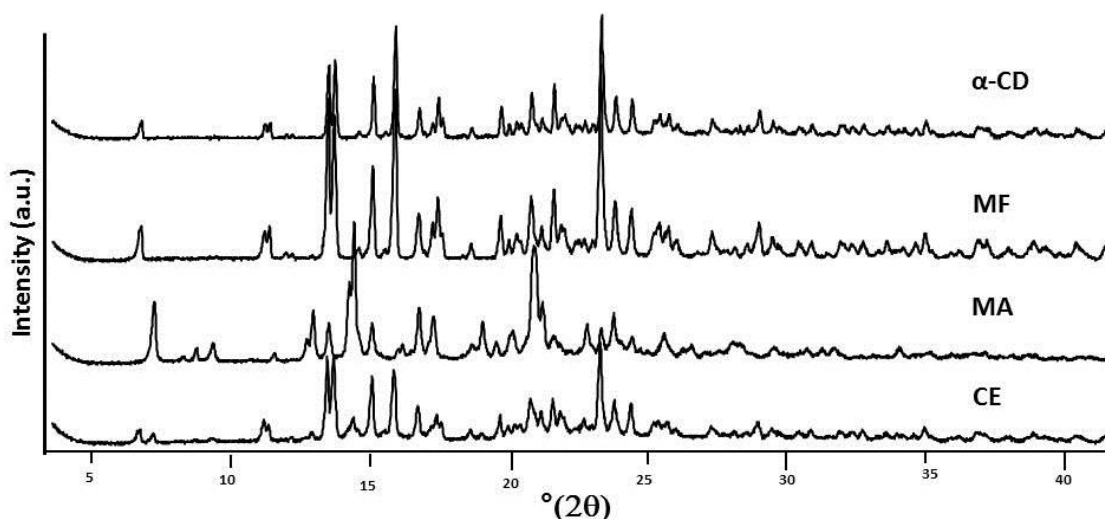
Tabela 4. Determinação das razões de complexação pelos métodos da mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE) em β -ciclodextrina (β -CD).

Amostra	Extrações		Conc. % diferença das extrações do limoneno	
	Superficial	Total	Limoneno Compl.	Complexação
MF	0,90	0,64	-0,26	Nenhuma
MA	9,19	1,01	-8,18	Nenhuma
CE	6,51	15,91	9,4	1:1,44

5.3. Difração de Raios X (DRX)

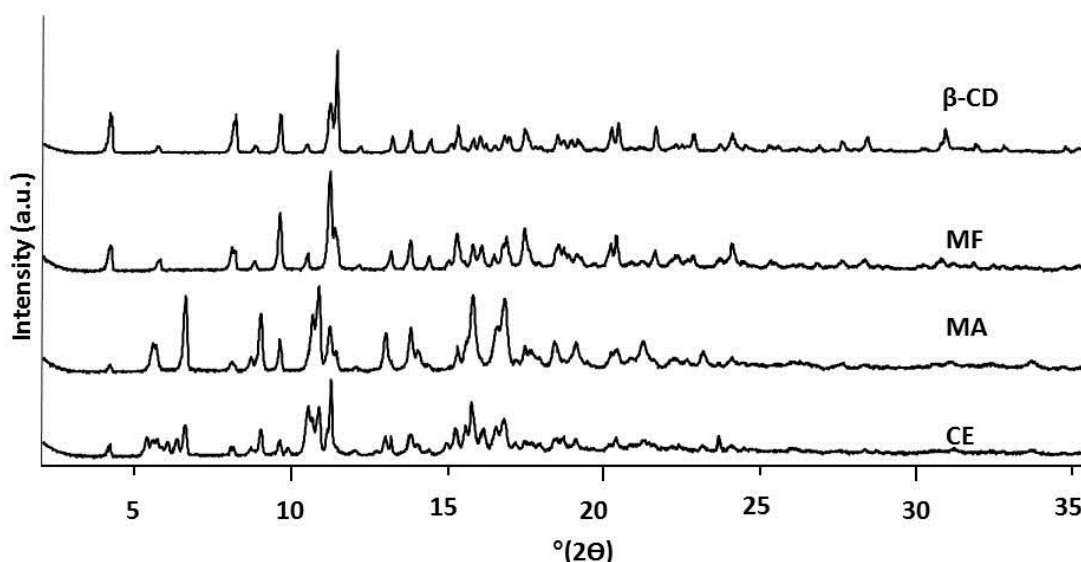
Os difratogramas das amostras de α -CD, β -CD, e suas respectivas MF, MA e CE são mostrados nas Figuras 12 e 13. De acordo com essas Figuras pode-se observar que a α -CD e β -CD apresentam picos característicos de compostos cristalinos. Nas Figuras 12 e 13 apresentam o padrão de difração de raios X da mistura física bastante similar aos encontrados para a α -CD e β -CD puras. Esse é um indicativo da baixa eficiência de complexação. Ao observar as reflexões da MA e CE (Figuras 12 e 13), pode-se verificar o surgimento de novos picos e a ausência de picos característicos da α -CD e β -CD puras. No difratograma da amostra MA existem deslocamentos e aparecimento de novas reflexões quando comparado a α -CD pura. Mudanças do padrão de difração também foram observados para a MA e a CE para os complexos com β -CD. Ao se observar a Figura 13, pode-se perceber que a MA e o CE apresenta reflexões que não aparecem na β -CD e na MF.

Figura 12. Difração de raios X da α -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE).



Diversos estudos tem apresentado a técnica de DRX como um método qualitativo indicativo da formação de complexos de inclusão pela formação de novas fases cristalinas ou pela amorfização das ciclodextrinas quando complexadas.

Figura 13. Difração de Raios X da β -ciclodextrina (β -CD), mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE).



5.4. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR)

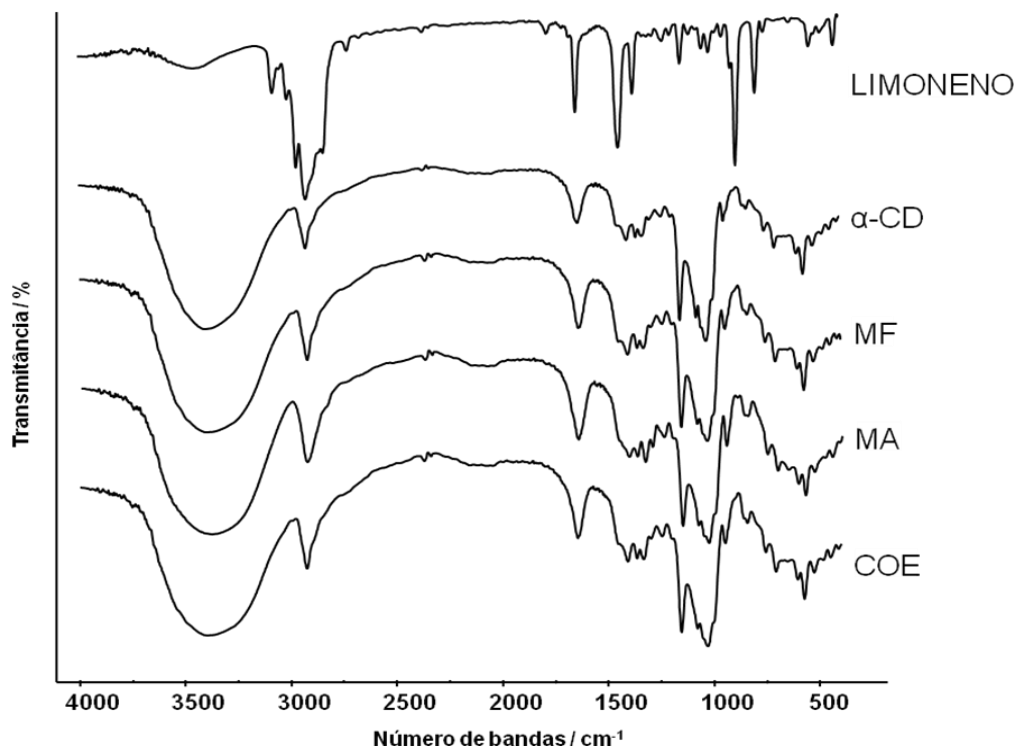
O FTIR é um instrumento analítico útil para verificar a formação de complexos de inclusão no estado sólido. A base das informações sobre a complexação com ciclodextrinas por FTIR surgem a partir do deslocamento de banda e mudanças nas suas intensidades quando compara-se os compostos isolados e seus complexos (RAJENDIRAN et al, 2014). Na Figura 14 é apresentado o espectro de FTIR da α -CD, LIM e os complexos de inclusão que foram obtidos pelos métodos da mistura física (MF), malaxagem (MA) e co-evaporação (CE).

No espectro que corresponde ao limoneno é possível observar uma banda em 3077 cm^{-1} que corresponde ao estiramento $-\text{CH}$ de alceno e os picos encontrados em 2966 , 2925 e 2843 cm^{-1} correspondem a deformação angular CH_3 e CH_2 que podem estar ligados a carbonos primários e secundários. A presença dos picos situados em 1645 e 1447 cm^{-1} indicam vibrações do estiramento $\text{C}=\text{C}$ característicos de cicloalceno. O pico encontrado em 1376 cm^{-1} corresponde a deformação angular CH_3 e outro encontrado em 895 cm^{-1} corresponde a $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$ (onde R representa ramificações presentes na estrutura do composto).

O espectro no infravermelho da α -CD pura (Figura 14) mostra uma banda larga característica desta CD, com o máximo de absorção em 3389 cm^{-1} , referente as vibrações do alongamento dos diferentes grupos hidroxilas presentes na α -CD. A banda observada em 1637 cm^{-1} , também está relacionada com as vibrações de reflexão referentes a esses grupos OH. No espectro, é possível observar outras bandas importantes características desta CD em 2920 cm^{-1} . Estas, relacionam-se com as vibrações CH e alongamento dos grupos CH e CH_2 , em 1409 , 1359 , 1329 , 1293 e 1242 cm^{-1} , e em 1150 , 1182 e 1034 cm^{-1} podem ser atribuídas as vibrações do alongamento C-O, das ligações entre os grupos éter e hidroxila presente na molécula da CD. As faixas típicas na região $1034\text{-}706\text{ cm}^{-1}$, características das vibrações de ligações C-H e do esqueleto C-C pertencentes ao anel de glicopirranose.

Na análise dos espectros correspondentes aos complexos de inclusão obtidos pelos métodos da MF, MA e CE é possível observar um perfil muito semelhante entre todas as amostras. Elas se assemelham a espectro da α -CD pura devido aos complexos terem sido preparados em razão molar (limoneno $136,24\text{ g/mol}$ e α -CD 972 g/mol). No entanto, algumas variações foram encontradas principalmente no espectro da amostra obtida por MA. As bandas de absorção nas faixas de $2955 - 2896\text{ cm}^{-1}$ e na região de $1682 - 1611\text{ cm}^{-1}$ mostraram-se mais alargadas, além disso foi observado um aumento da intensidade da banda do MA em 947 cm^{-1} (característica do grupo alceno).

Figura 14. Os espectros de infravermelho de limoneno (LIM), α -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e coevaporado (COE).

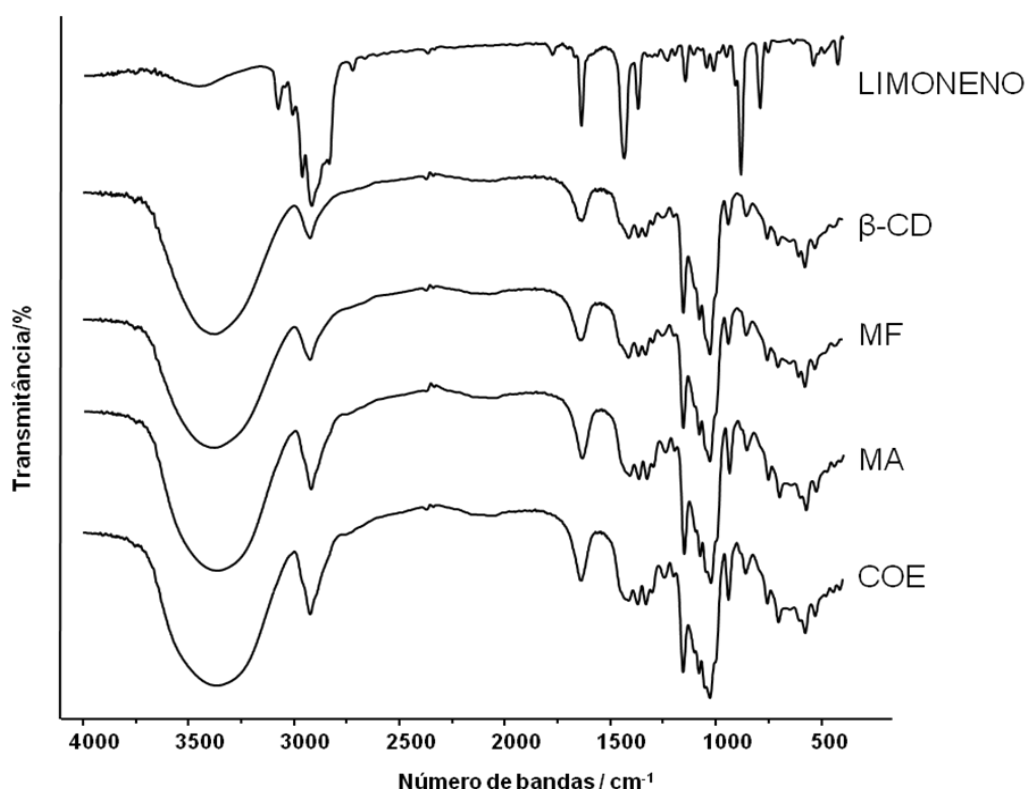


Na Figura 15 é apresentado o espectro de FTIR da β -CD, LIM e os complexos de inclusão que foram obtidos pelos métodos da MF, MA e CE. O espectro de infravermelho da β -CD pura mostrou uma banda larga com máximo de absorção centralizada a cerca de 3341 cm^{-1} , devido as vibrações do alongamento dos diferentes grupos hidroxila O-H da β -CD. A banda em 1647 cm^{-1} , bem visível está relacionada com as vibrações desses grupos O-H. O espectro apresenta uma série de outras bandas, principalmente a 2926 cm^{-1} (vibrações C-H e de alongamento dos grupos CH e CH_2), em 1411 , 1368 , 1335 , 1301 e 1246 cm^{-1} devido as vibrações de alongamento C-H, e em 1154 , 1080 e 1027 cm^{-1} são atribuídas as vibrações características do grupo C-O, das ligações entre os grupos de éter e hidroxila. Finalmente faixas típicas da região $1000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, pertencentes as vibrações das ligações C-H e as vibrações do esqueleto C-C no anel de

glucopirranose, também estão presentes. Resultados semelhantes foram encontrados por SAMBASEVAM et al, 2013 e MENEZES et al, 2014.

Na análise das bandas que correspondem aos complexos de inclusão obtidos pelos métodos da MF, MA e CE observa-se que o complexo obtido pelo método da MA e CE mostram semelhança ao espectro da β -CD. No entanto, bandas de absorção em $2968 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ e na região de $1689 - 1577 \text{ cm}^{-1}$, mostraram alargadas quando comparadas com a MF. Além disso, a banda em 937 cm^{-1} das amostras MA e CE mostraram-se mais acentuadas sugerindo-se assim uma maior eficiência de complexação para esses métodos.

Figura 15. Os espectros de infravermelho de limoneno (LIM), β -CD, mistura física (MF), malaxagem (MA) e coevaporado (COE).



5.5. Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura é adequada para avaliar a formação de complexos de inclusão, uma vez que ela fornece informações acerca da forma e tamanho das amostras (RAJENDIRAN et al, 2014). Na Figura 16 é apresentada as imagens da α -CD pura, da MF e respectivos complexos de inclusão. Na Figura 17 é apresentada as imagens da β -CD, MF e complexos de inclusão. A α -CD apresenta-se superficialmente como cristais prismáticos (KAYACI et al, 2013), enquanto que as fotomicrografias da β -CD, revelam uma superfície retangular com fragmentos de cristais aderidos, e possui tamanhos variáveis conforme descrito por Hădărugă 2012 e Dandawate et al 2014. Nas misturas físicas é possível distinguir as partículas do óleo das partículas de CDs. Porém, quando um complexo é formado, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura da molécula hóspede com as CD (LYRA et al, 2010). Dessa forma, justifica-se a não formação de complexos de inclusão do MF- α -LIM, bem como MF- β -LIM. Já as amostras referentes aos complexos de inclusão apresentaram-se como agregados cristalinos, o que sugere que o LIM foi incluso na cavidade da CD, sobretudo pelo método da MA- α -LIM e CE- α -LIM. Dessa forma, mudanças nas características cristalinas das CDs puras caracterizam o fenômeno da inclusão molecular (RAJENDIRAN et al 2014).

Nas Figuras 18 e 19 são apresentadas as imagens obtidas para α e β -CD, misturas físicas e seus complexos obtidas com aumento de 600x.

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 1000 x e 3000x de: α -CD; MF- α -CD+LIM; MA- α -CD+LIM; CoE- α -CD+LIM.

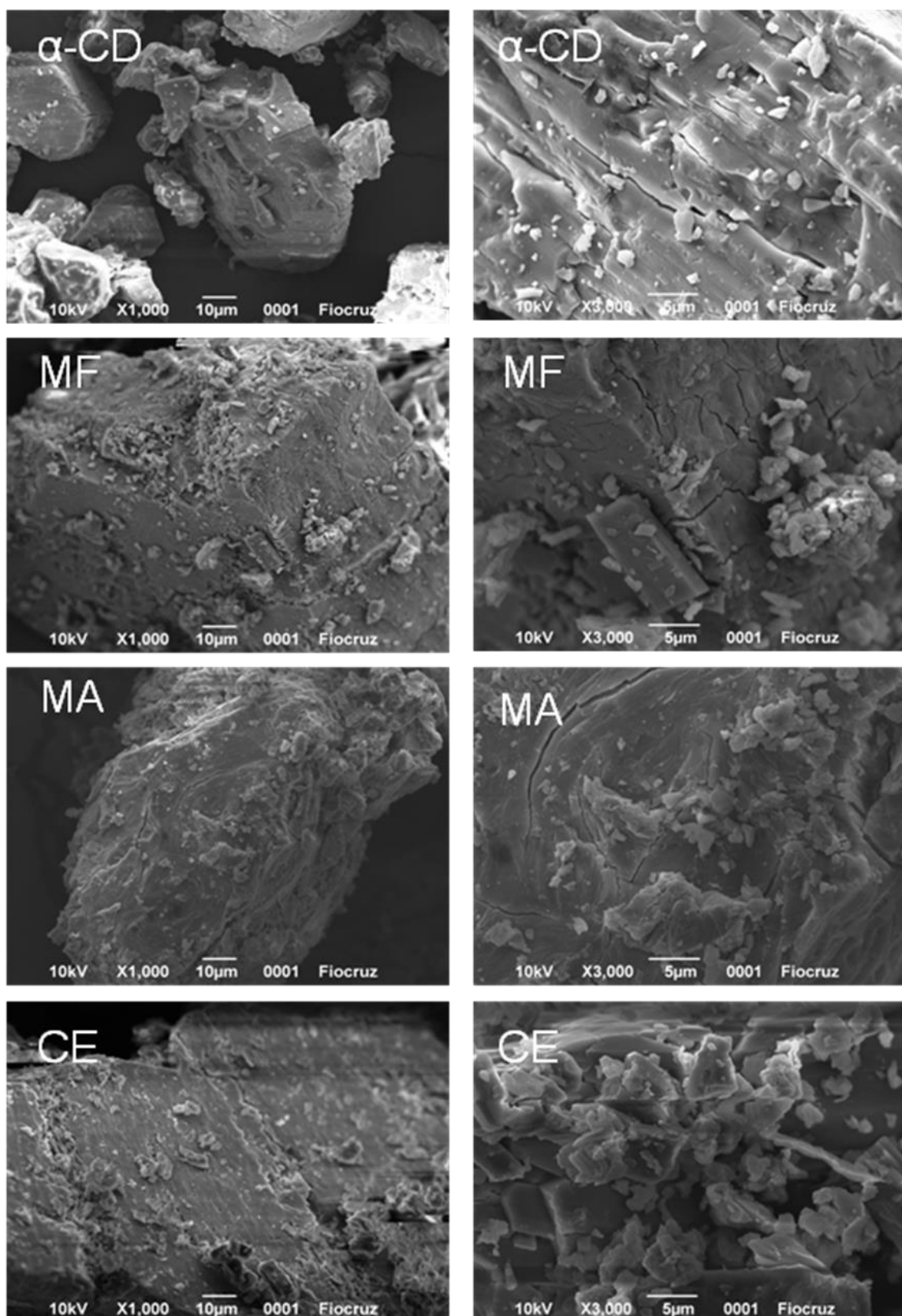


Figura 17. Microscopia Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 1000 x e 3000x de: β -CD; MF- β -CD+LIM; MA- β -CD+LIM; CoE- β -CD+LIM.

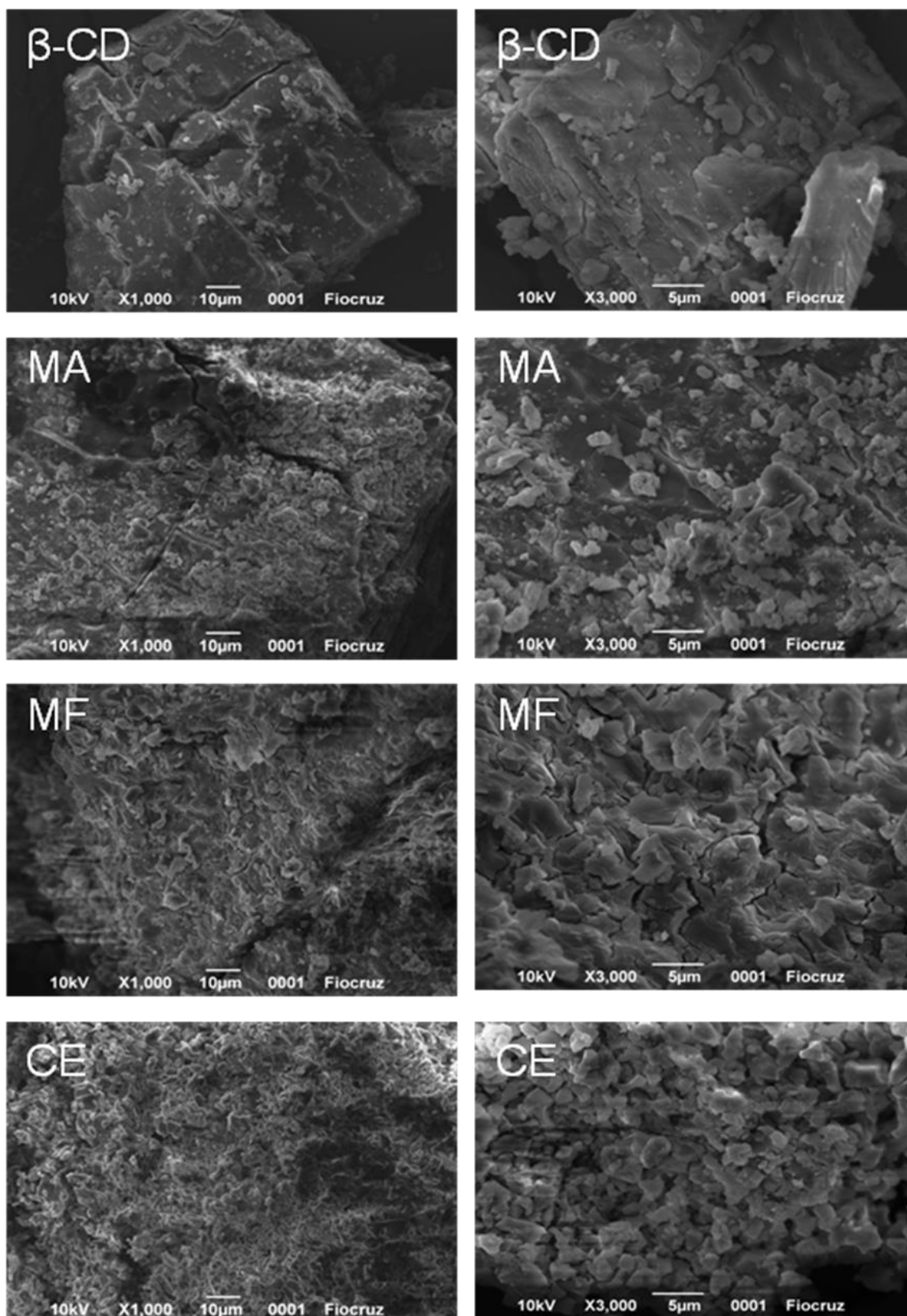


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 600x de: α -CD; MF- α -CD+LIM; MA- α -CD+LIM; CoE- α -CD+LIM.

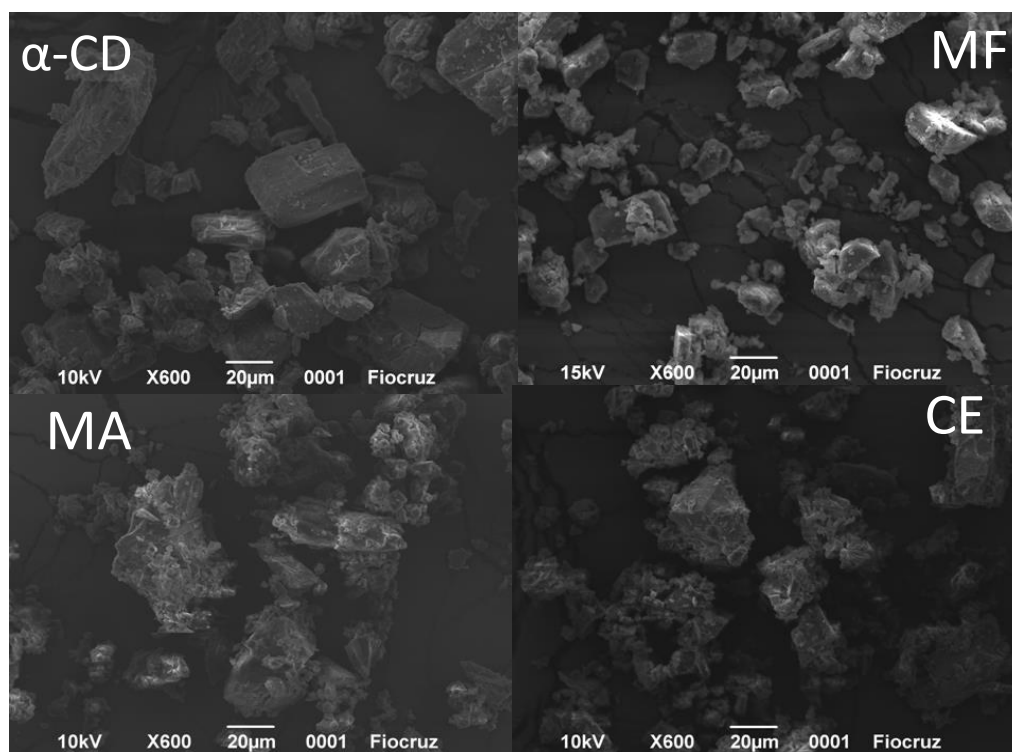
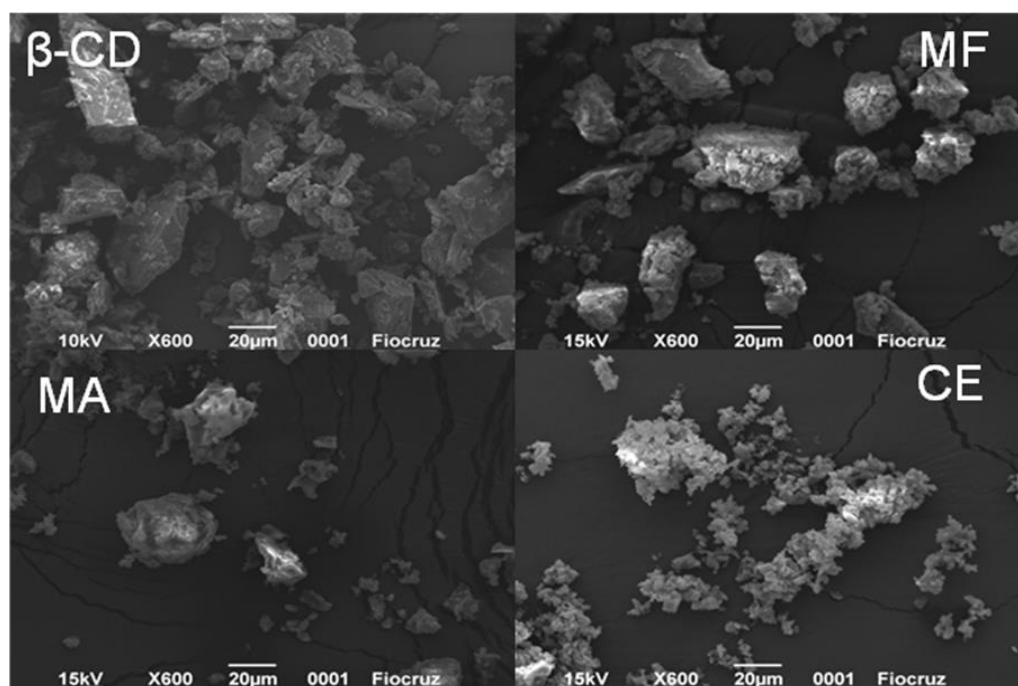


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 600x de: β -CD; MF- β -CD+LIM; MA- β -CD+LIM; CoE- β -CD+LIM.

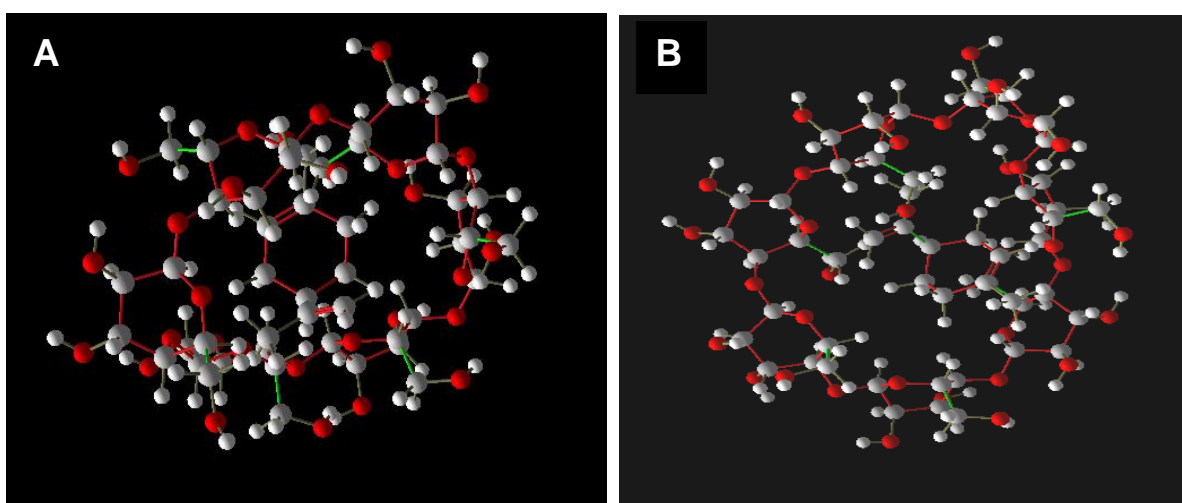


5.6. Modelagem Molecular (*Docking*)

A análise por simulações de modelagem molecular (*Docking*) utilizando um método de mecânica molecular com cálculos AutoDock tem por objetivo investigar afinidade entre o limoneno e as ciclodextrinas por meio das energias de ligação, potenciais locais de ligação e prever a sua estabilidade pela diferença nas energias de interação (YANG et al, 2011). O cálculo da energia de ligação representa principalmente o alcance das forças de van der Waals e as interações eletrostáticas (XIONG et al, 2014).

O valor numérico mais elevado da energia significa mais forte interação entre as moléculas. As figuras a seguir mostram a modelagem molecular da simulação da interação do limoneno em α e β -CD. Os resultados teóricos apresentaram, variações de energia após a formação dos complexos de inclusão. As energias internas após a análise foram de -4,49 kcal/mol para limoneno/ α -CD e -4,04 kcal/mol para limoneno/ β -CD, ou seja, a α -CD mostra uma estabilidade superior para complexação com o limoneno quando comparada a β -CD devido ao tamanho da cavidade e possibilidade de interações.

Figura 20. Representação molecular do complexo de inclusão do limoneno com α -CD (A) com energia de ligação de -4.49kcal/mol e β -CD (B) com energia de ligação de -4.04kcal/mol.



5.7 Estudo cinético da primeira etapa de perda de massa

Nas Figuras 21, 23, 25, 27 estão apresentadas as curvas TG, e o comportamento térmico da α -CDs, da misturas física e dos complexos obtidos por MA e CE, nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 15°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min⁻¹). Nas Figuras 29, 31, 33 e 35 estão apresentados os resultados para a β -CD. Os eventos térmicos observados pelas curvas TG podem ser atribuídos à eliminação de água fisiossorvida no caso das substâncias puras; e de água fisiossorvida mais limoneno aderido a superfície da ciclodextrina, no caso das misturas físicas e complexos. A partir da relação entre os percentuais de perda de massa com aqueles de energia cinética envolvida na primeira etapa de decomposição térmica, foi possível projetar um gráfico do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura, como mostrado nas figuras inseridas (Método dinâmico de Ozawa).

Os gráficos de Ozawa representando a relação entre a massa residual da amostra pelo tempo reduzido são apresentados nas Figuras 22, 24, 26, 28, 30, 32 e 34.

Figura 21. Curvas TG da α -ciclodextrina obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

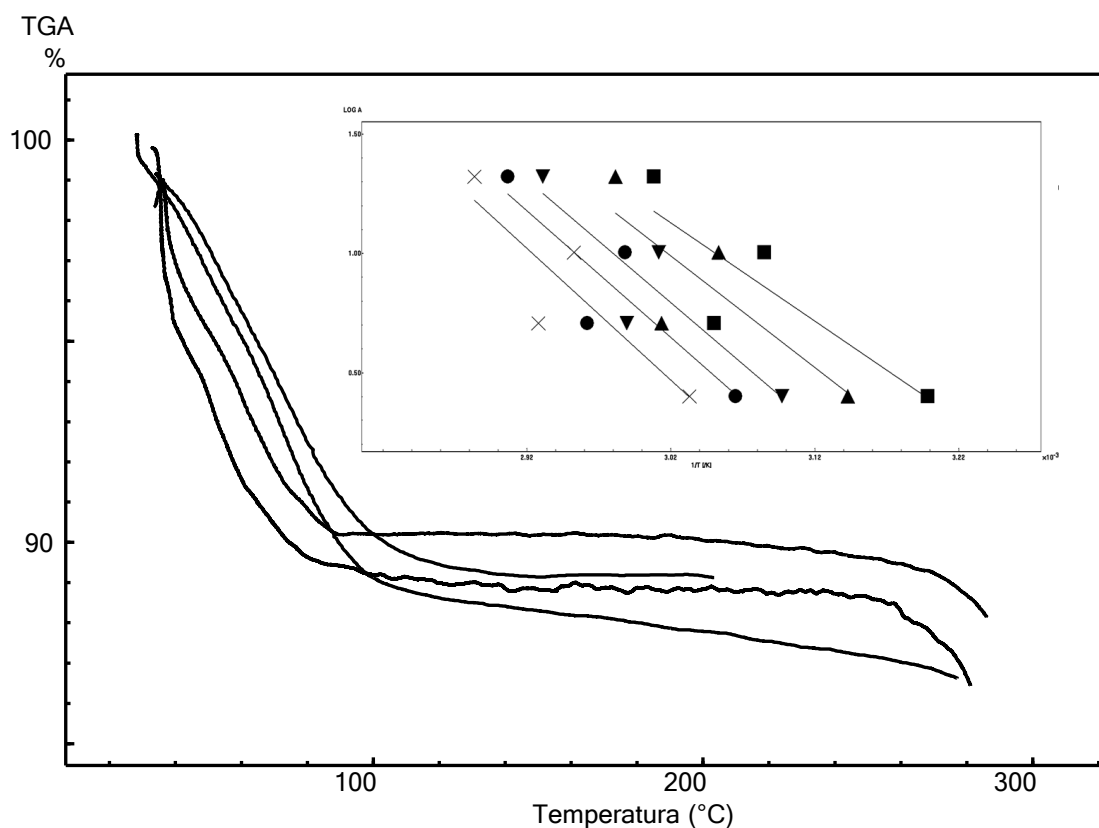


Figura 22. Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura para α -CD.

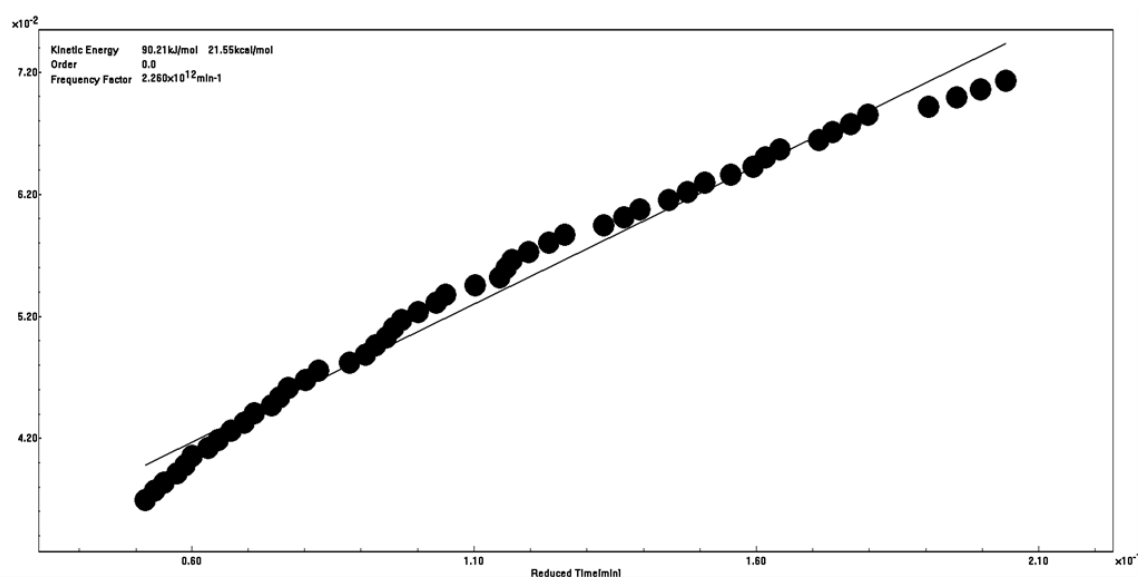


Figura 23. Curvas TG da mistura física α -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de Al. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

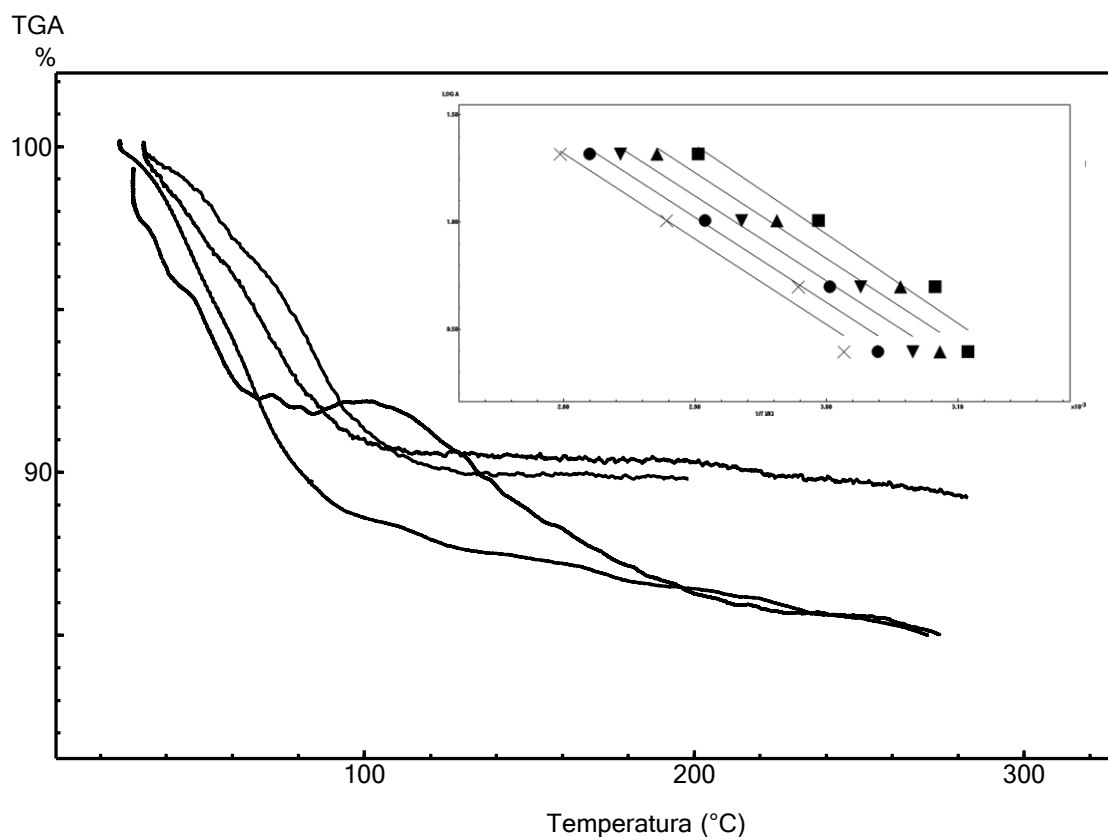


Figura 24. Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da MF α -CD/Limoneno

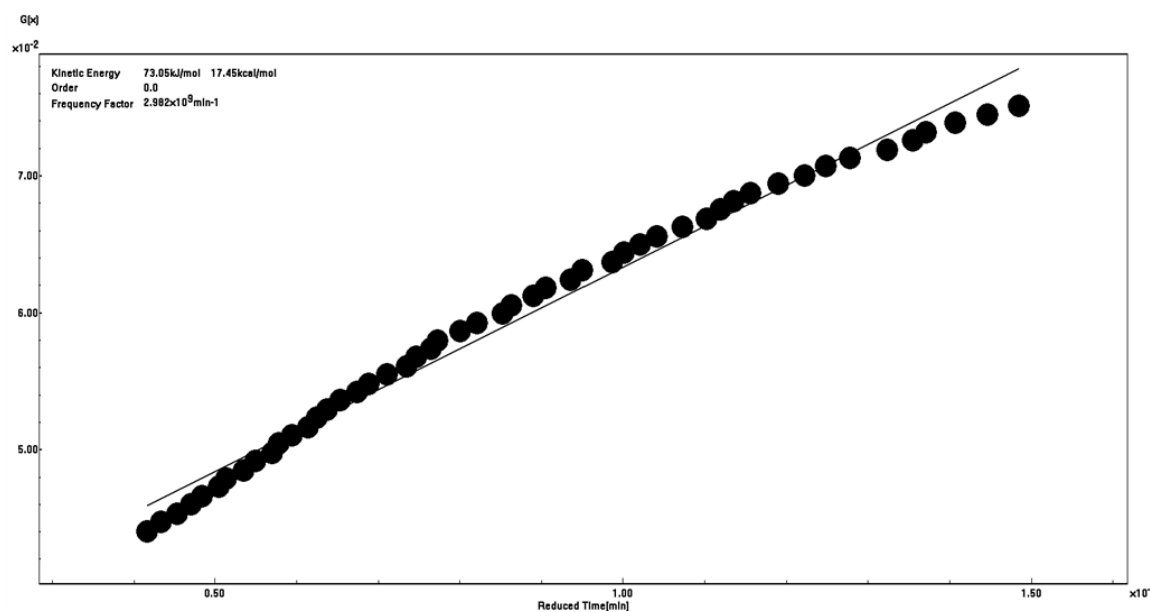


Figura 25. Curvas TG do complexo obtido por malaxagem da α -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

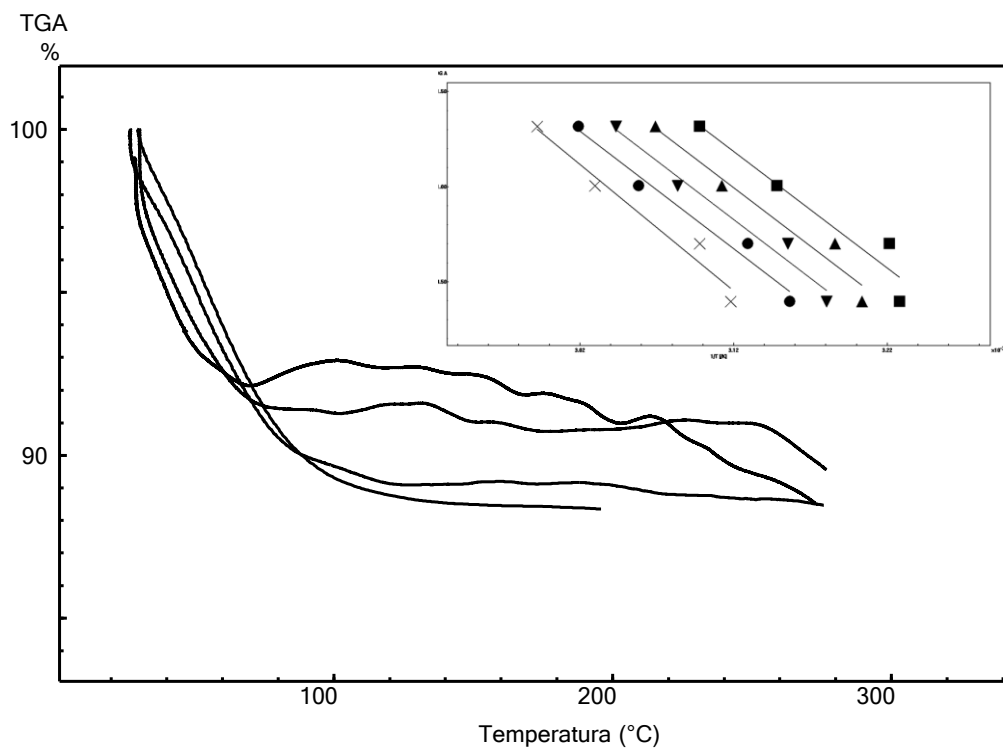


Figura 26. Gráfico da função $G(x)$ do inverso da temperatura da MA α -CD/Limoneno.

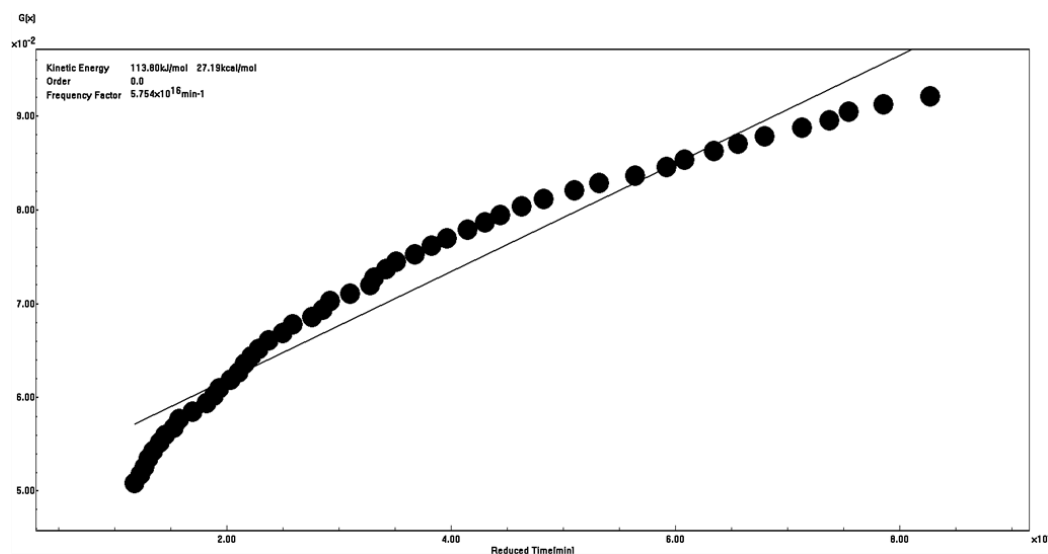


Figura 27. Curvas TG do complexo obtido por co-evaporação da α -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

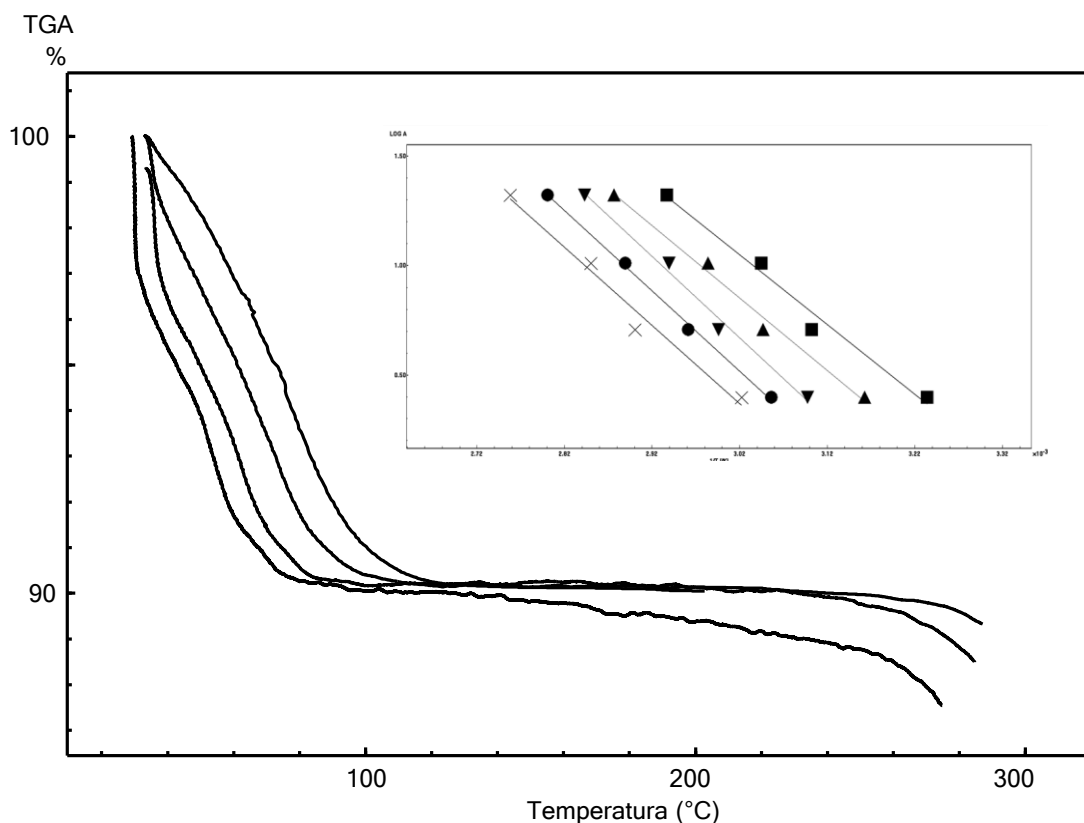


Figura 28. Gráfico da função $G(x)$ do inverso da temperatura da CE α -CD/Limoneno.

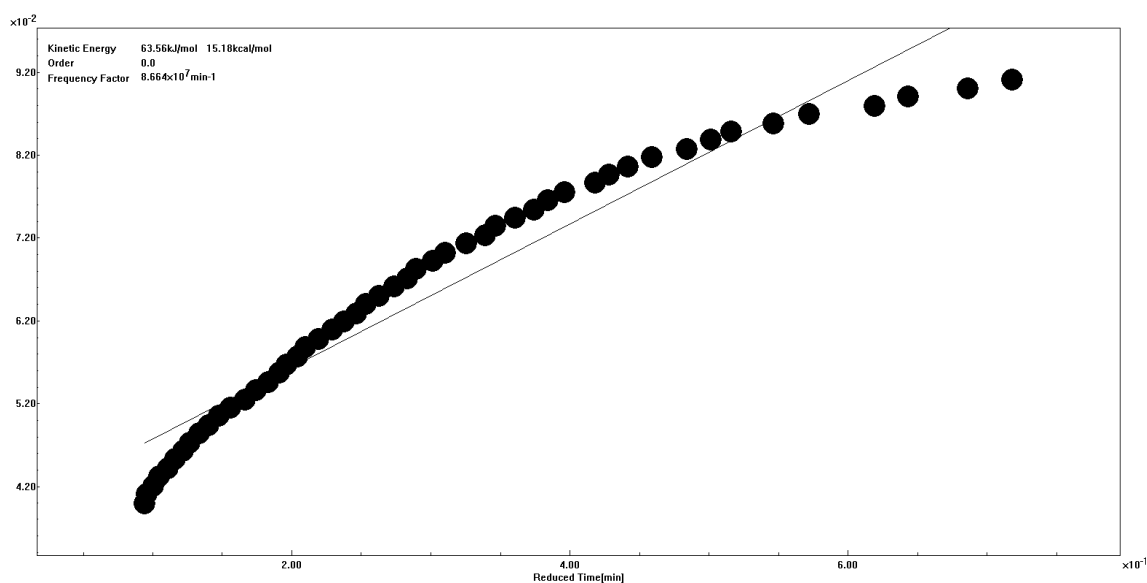


Figura 29. Curvas TG da β -ciclodextrina obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

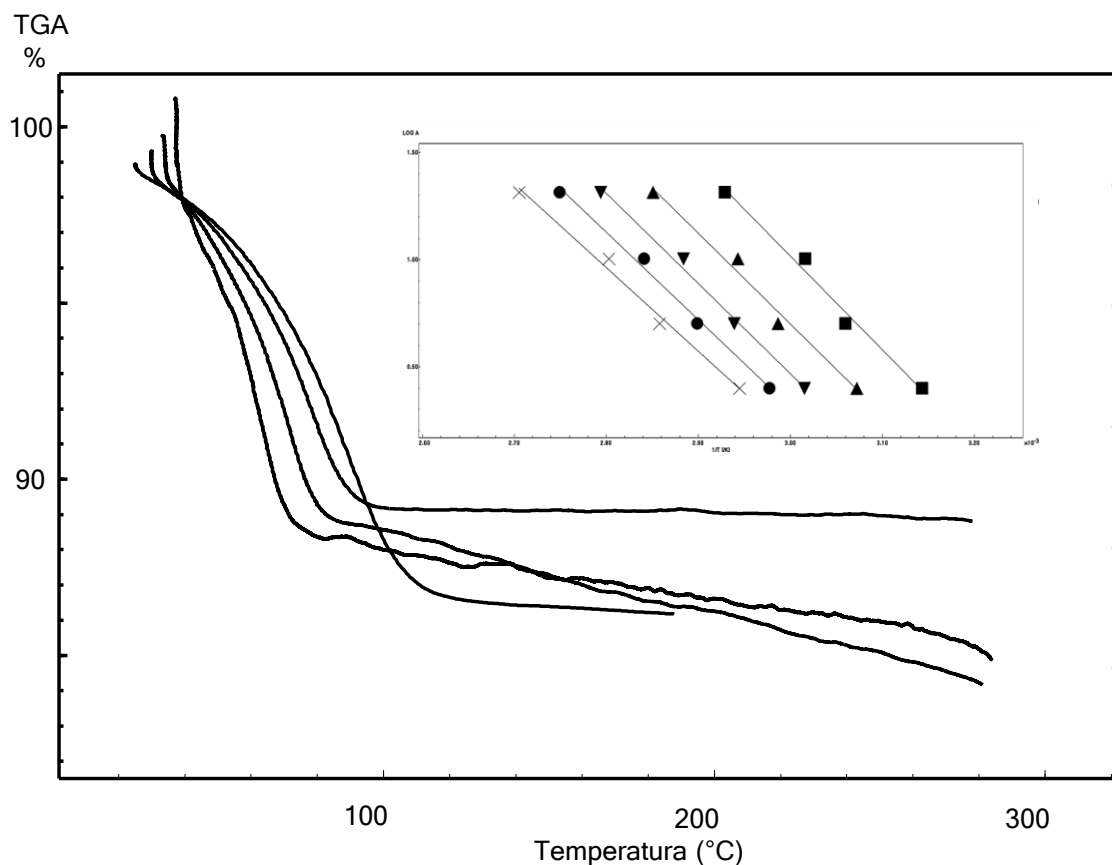


Figura 30. Gráfico da função $G(x)$ do inverso da temperatura da β -CD.

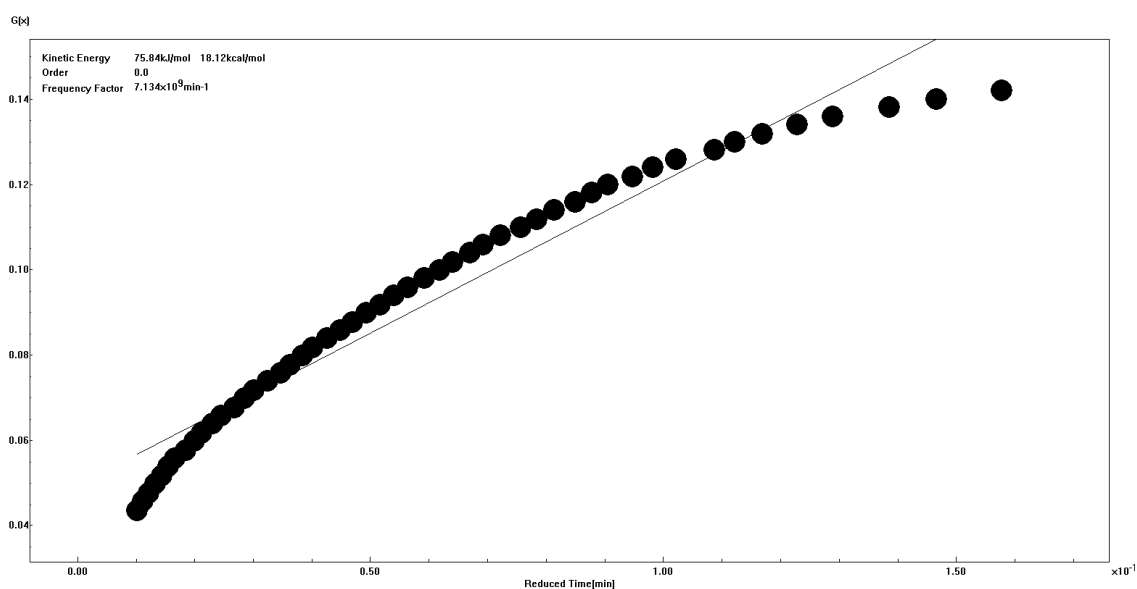


Figura 31. Curvas TG da mistura física da β -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

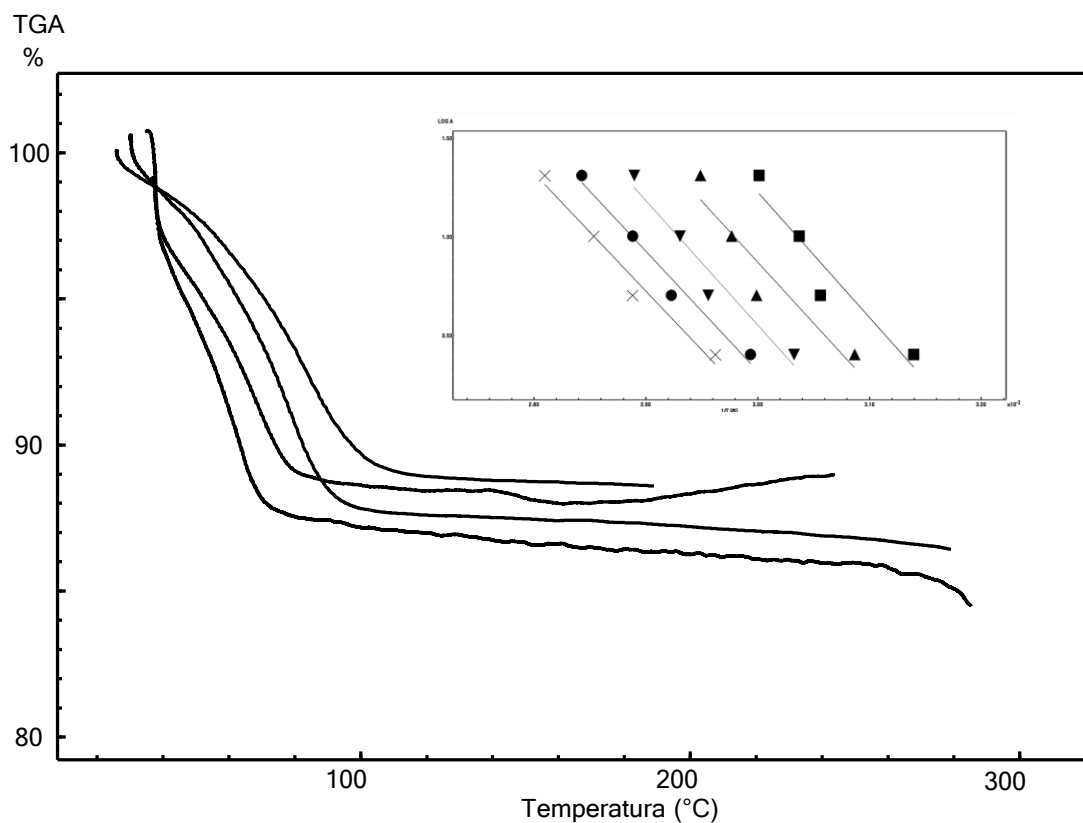


Figura 32. Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da MF β -CD/Limoneno.

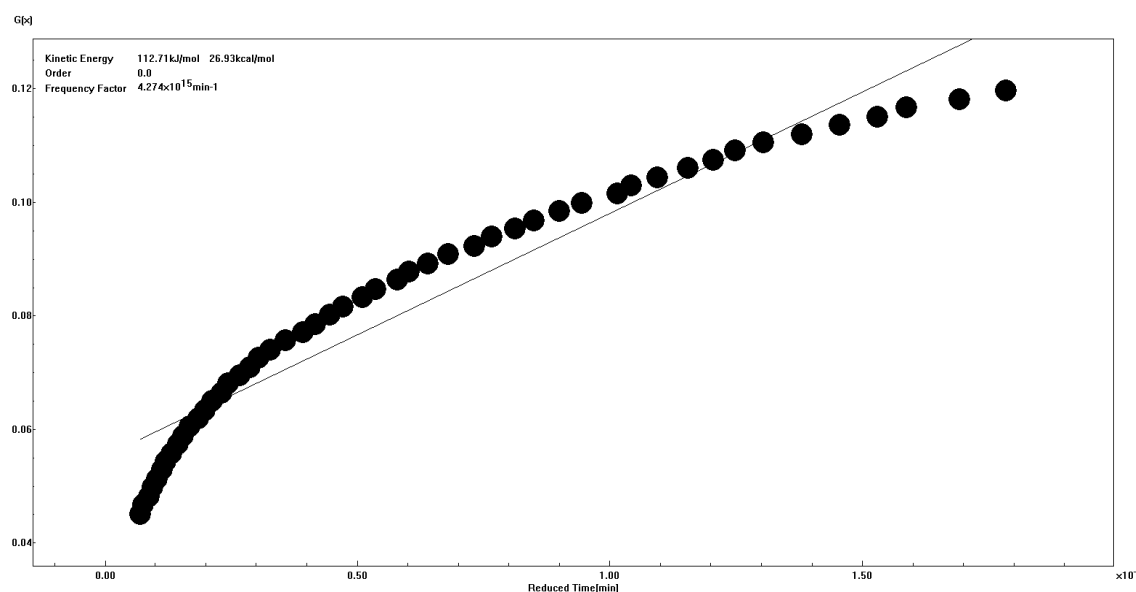


Figura 33. Curvas TG do complexo obtido por malaxagem da β -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

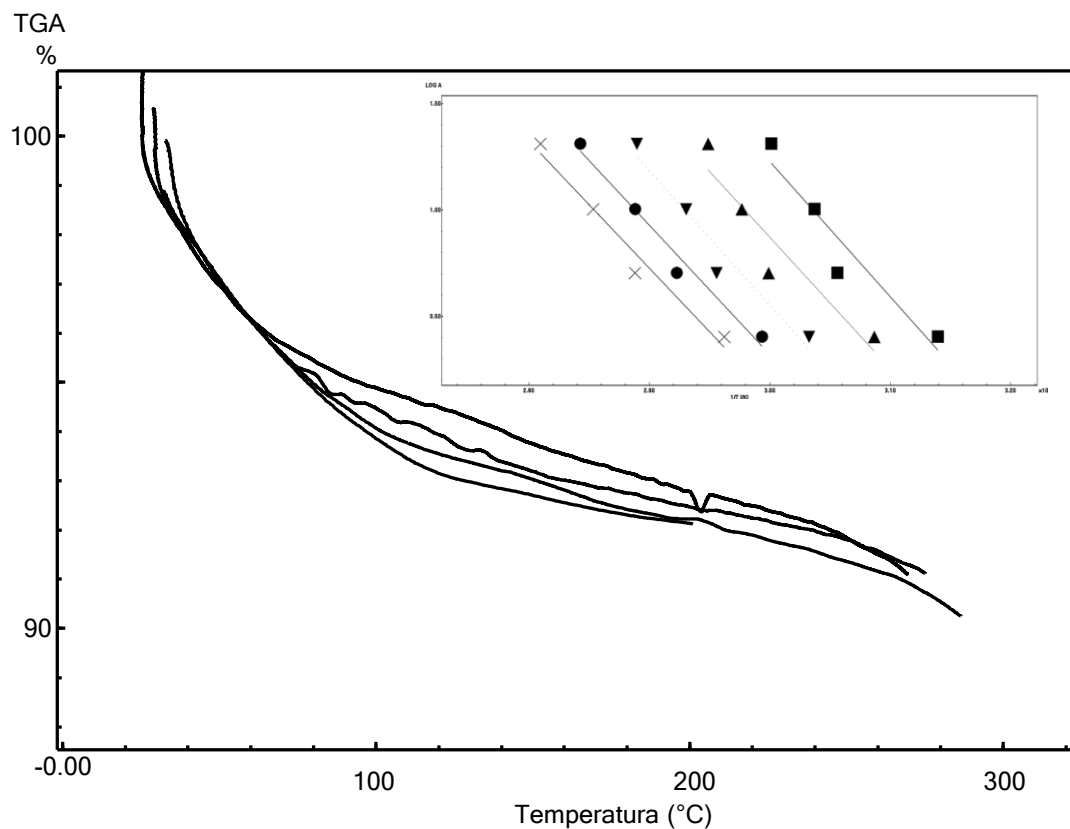


Figura 34. Gráfico da função $G(x)$ do inverso da temperatura da MA β -CD/Limoneno.

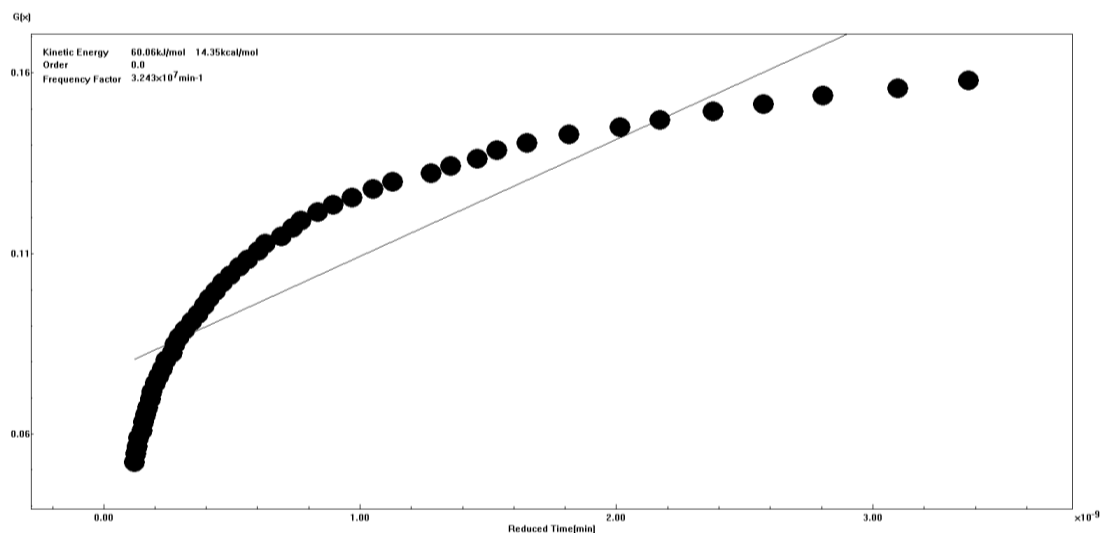


Figura 35. Curvas TG do complexo obtido por co-evaporação da β -ciclodextrina/Limoneno (1:1 molar) obtidas nas razões de aquecimento de 2,5 - 5,0 - 10 e 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL.min⁻¹) massa ~2 mg, cadinho de alumínio. Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura obtida pelo método de Ozawa (no detalhe).

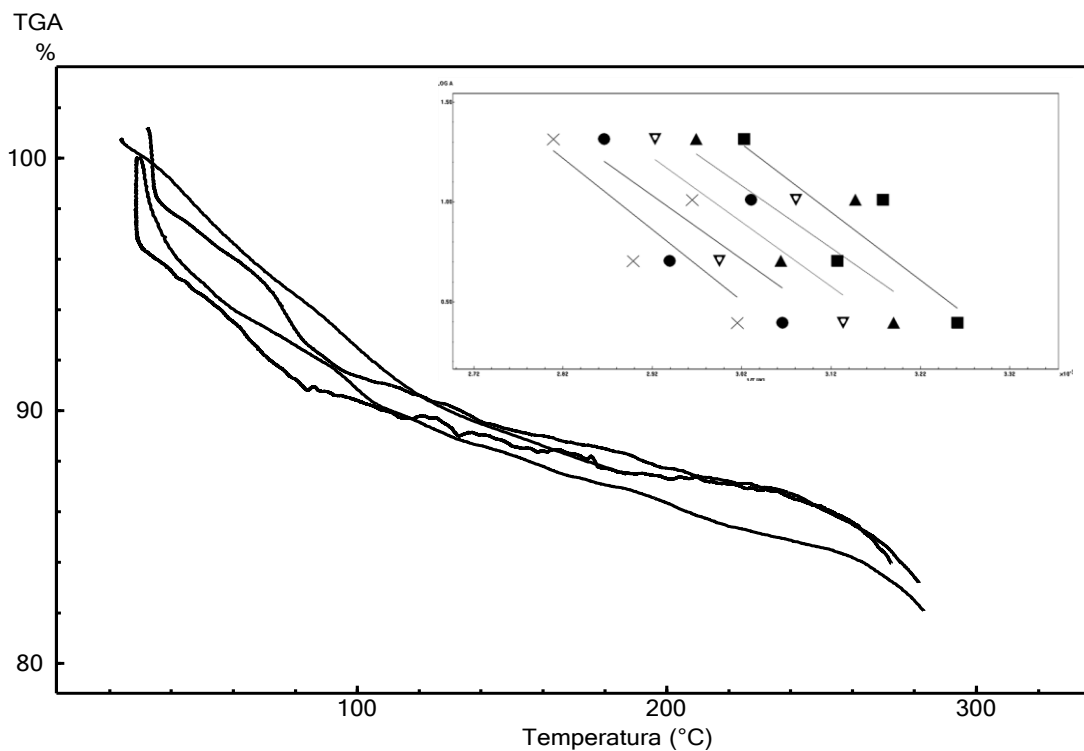
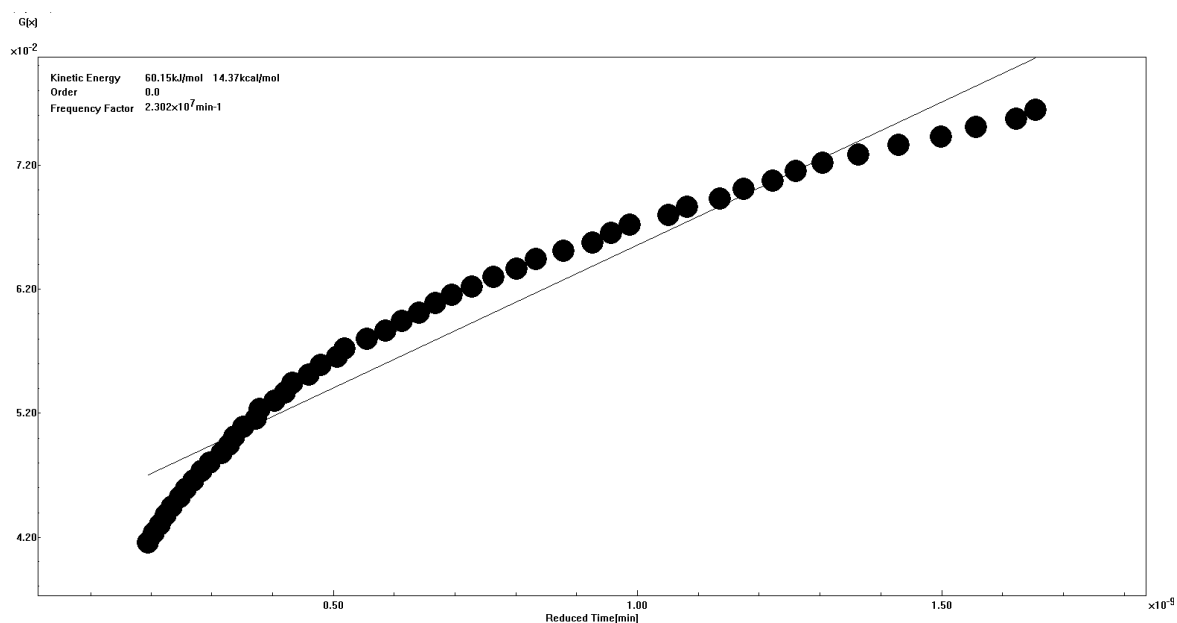


Figura 36. Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura da CE β -CD/Limoneno.



Na Tabela a seguir está descrito os resultados de energia de ativação para primeira etapa de perda de massa obtidos a partir destes gráficos.

Tabela 5. Resultados dos valores de energia de ativação para primeira etapa de decomposição térmica dos complexos de limoneno com α e β -ciclodextrina.

	Amostra	Ea (kJ/mol)
α -CD	Pura	90,21
	MF	73,05
	MA	113,80
	CE	63,56
β -CD	Pura	75,84
	MF	112,71
	MA	60,06
	CE	60,15

Esses resultados sugerem, como é esperado, uma redução da energia de ativação a medida que o componente volátil é incorporado as ciclodextrinas. Resultados divergentes foram encontrados para o MA obtido com a α -CD e a MF obtida com a β -CD.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

- Os complexos de inclusão de limoneno (CIL) com α e β - CD preparados por três diferentes métodos (mistura física, malaxagem e co-evaporação) apresentaram diferenças quanto aos seus aspectos físico-químicos e morfológicos;
- O perfil de termoanalítico observado por calorimetria exploratória diferencial (DSC) mostrou maior interação principalmente para os complexos obtidos por MA para α -CD e CE para β -CD.
- A análise do limoneno e dos complexos obtidos, por termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) mostrou baixa eficiência de complexação para α -CD e valores de perda de massa elevados (em torno de 8%) na faixa de temperatura de 120-270°C, características de componentes voláteis para a β -CD tanto para o método MA como CE.
- Os resultados obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) mostraram que a maior relação entre a quantidade de limoneno adsorvido a superfície e complexado foi para a amostra obtida por malaxagem para α -CD. Resultados promissores foram também obtidos para os complexos limoneno- α -CD obtidos por malaxagem e limoneno- β -CD obtida por co-evaporação.
- As análises por DRX mostraram diferença importantes no perfil de difração das amostras obtidas principalmente por CE tanto para α quanto para β -CD.
- Os complexos de inclusão caracterizados por espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) mostraram mudanças de algumas bandas características do limoneno o que fortalece a hipótese de complexação.
- A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou mudanças na superfície e tamanho dos aglomerados cristalinos quando comparados com as CDs puras, principalmente para o método de preparação por CE.
- O estudo de *docking* entre o limoneno e a α e a β -CD mostrou uma maior estabilidade (energia de ligação) devido as interações entre o limoneno e a α -CD.
- A cinética da primeira etapa de decomposição térmica dos compostos isolados e dos complexos utilizando o método não-isotérmico de Ozawa mostraram de forma preliminar que este pode ser um bom modelo para prever a eficiência de complexação a partir da energia cinética de volatilização.

Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

Devido aos resultados promissores e satisfatórios obtidos no presente trabalho experimental, seria interessante como trabalho futuro explorar os seguintes aspectos:

- Ensaio de estabilidade de longa duração nos complexos de inclusão, pois a baixa solubilidade em água do limoneno e alta volatilidade compromete as perspectivas de uso terapêutico.
- Realizar estudos nos complexos de inclusão com limoneno utilizando determinados solventes orgânicos em diferentes concentrações, com o objetivo de verificar a quantidade do limoneno complexado nas cavidades das ciclodextrinas.
- Estudos de incorporação dos complexos de inclusão de limoneno em α - e β -CD em filmes ou desenvolver formas farmacêuticas que apresentem perfil de cinética de liberação adequada, estabilidade desejada e que a sua produção em escala industrial não represente custo elevado, tanto na tecnologia de fabricação quanto no que concerne ao custo das matérias-primas.
- Caracterização reológica formulações desenvolvidas.
- Realizar estudos *in vivo* em animais, de forma a avaliar o aumento da biodisponibilidade e/ou do efeito terapêutico do limoneno após a formação do complexo de inclusão em α - e β -CD.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, U.N.; LIMA, S.G.; ROCHA, M.S.; FREITAS, R.M.; OLIVEIRA, T.M.; SILVA, R.M.; MOURA, L.C.B.; ALMEIDA, L.T.G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**. v.37, p. 50-55, 2014.

ALLINGER, N.L. A hydrocarbon force-field utilizing V1 and V2 torsional terms. **Journal of the American Chemical Society**. v.99, p.8127–8134, 1977.

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; SILVA, O.A.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.118, p.69–78, 2014.

ALVES, L.D.S.; LYRA, M.A.M.; ROLIM, L.A.; PRESMICH, G.M.A.; ROLIM-NETO, P.J. Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.33; p.17-25, 2012.

ANCONI, C.P.A.; NASCIMENTO JR, C.S.; DE ALMEIDA, W.B.; DOS SANTOS, H.F. Theoretical study of covalently bound α -cyclodextrin associations. **The Journal of Physical Chemistry C**. v. 116, p.18958-18964, 2012.

ANDRADE, P.F.; FARIA, A.F.; SILVA, D.S.; BONACIN, J.A.; GONÇALVES, M.C. Structural and morphological investigations of β -cyclodextrin-coated silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.032>, 2014.

ARRIETA, M.P.; LÓPEZ, J.; FERRÁNDIZ, S.; PELTZER, M. Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. **Polymer Testing**. v.32, p.760–768, 2013.

ARRUDA, D.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; KATZIN, A.M.; ULIANA, S.R.B. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.63, p.643-649, 2009.

ARSLAN, I.; CELIK, A.; MELZIG, M.F. Nebulosides A–B, novel triterpene saponins from under-ground parts of *Gypsophila arrostii* Guss. var. *nebulosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.21, p.1279–1283, 2013.

ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**. v.23, p.1631–1640, 2009.

BADEE, A.Z.M.; HELMY, S.A.; MORSY, N.F.S. Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202). **Food Chemistry**. v.126, p.849–854, 2011.

BAI, Y.; WANG, J.; BASHARI, M.; HU, X.; FENG, T.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. A thermogravimetric analysis (TGA) method developed for estimating the stoichiometric ratio of solid-state α -cyclodextrin-based inclusion complexes. **Thermochimica Acta**. v.541, p.62–69, 2012.

BELICA, S.; SADOWSKA, M.; STEPNIAK, A.; GRACA, A.; PAŁECZ, B. Enthalpy of solution of α - and β -cyclodextrin in water and in some organic solvents. **The Journal of Chemical Thermodynamics**. v.69, p.112–117, 2014.

BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**. v.49, p.1610–1615, 2011.

BORGES, A.M.; CEOLIN, T.; BARBIERI, R.L.; HECK, R.M. A inserção das plantas medicinais enquanto prática da enfermagem: um crescente desafio. **Enfermería Global**. v. 18, p. 1-8, 2010.

BRITTO, M.A.F.O.; NASCIMENTO JR, C.S.; SANTOS, H.F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**. v.27, p.882-888, 2004.

CAFITO. **Fitoterapia**. Crf-sp, São Paulo, jul. 2009.

CAPUTO, G.; FERNÁNDEZ, I.G.; SALDAÑA, M.D.A.; GALIA, A. Advances and Perspectives of Supercritical Fluid Technology. **Journal of Chemistry**. Article ID 243653, 3 pages. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/243653>

CASTRONUOVO, G.; NICCOLI, M. Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with acetylsalicylic acid and ibuprofen in aqueous solution at 298 K. **Thermochimica Acta**. v.557, p.44–49, 2013.

ÇELİK, S.E.; ÖZYÜREK, M.; TUFAN, A.N.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.78, p.1615–1624, 2011.

CEVALLOS, P.A.P.; BUERA, M.P.; ELIZALDE, B. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**. v.99, p.70-75, 2010.

CHEN, Q.; MCGILLIVRAY, D.; WEN, J.; ZHONG, F.; QUEK, S.Y. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. **Journal of Food Engineering**. v.117, p.505–512, 2013.

CHENG, Y.; HUANG, Y.; ALEXANDER, K.; DOLLMORE, D. A thermal analysis study of methyl salicylate. **Thermochimica Acta**. v. 367-368, p. 23-28, 2001.

CHOI, M.J.; RUKTANONCHAI, U.; MIN, S.G.; CHUN, J.Y.; SOOTTITANTAWAT, A. Physical characteristics of fish oil encapsulated by β -cyclodextrin using an

aggregation method or polycaprolactone using an emulsion–diffusion method. **Food Chemistry**. v.119, p.1694–1703, 2010.

CIDES, L.C.S.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal behaviour, compatibility study and decompositions kinetics of Glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.84, p.441-445, 2006.

CIOBANU, A.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. **Food Research International**. v.53, p.110–114, 2013.

CIOBANU, A.; MALLARD, I.; LANDY, D.; BRABIE, G.; NISTOR, D.; FOURMENTIN, S. Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil. **Carbohydrate Polymers**. v.87, p.1963–1970, 2012.

COHEN, N.C. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design**; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1996.

COLOMA, A.G.; BALBOA, C.L.; REINA, M.; SANTANA, O.; FRAGA, B.M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**. v.10, n.2, p. 245-260, 2011.

CZECHA, C.; HAMMER, S.M.; BONN, B.; SCHMIDT, M.U. Adsorption sites, adsorption enthalpies and potential removal of terpenoids by atmospheric ice. **Atmospheric Environment**. v.45, p.687-693, 2011.

DAHLM, H.; GOLINSKA, P. Ectomycorrhiza and Secondary Metabolites. Chapter 16. **Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae Soil Biology**. v. 25, p. 371-385, 2011.

DANDAWATE, P.; VEMURI, K.; SWAMY, K.V.; KHAN, E.M.; SRITHARAN, M.; PADHYE, S. Synthesis, characterization, molecular docking and anti-tubercular

activity of Plumbagin–Isoniazid Analog and its β -cyclodextrin conjugate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.24, p.5070–5075, 2014.

DE ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; DE CARVALHO, R.B.F.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**. v.1448, p.56-62, 2012.

DEL TERRA, L.; LONZARICH, V.; ASQUINI, E.; NAVARINI, L.; GRAZIOSI, G.; LIVERANI, F.S.; PALLAVICINI, A. Functional characterization of three *Coffea arabica* L. monoterpene synthases: Insights into the enzymatic machinery of coffee aroma. **Phytochemistry**. v.89, p.6–14, 2013.

DE VOS, P. European materia medica in historical texts: longevity of a tradition and implications for future use. **Journal of Ethnopharmacology**. v.132, p.28–47, 2010.

DEWAR, M.J.S.E.; ZOEBISCH, G.; HEALY, E.F.; STEWART J.J.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**. v.107, p.3902–3909, 1985.

DING, L.; LI, Y.; JIA, D.; DENG, J.; YANG, W. β -Cyclodextrin-based oil-absorbents: Preparation, high oil absorbency and reusability. **Carbohydrate Polymers**. v.83, p.1990–1996, 2011.

DRUY, M.A. Applications for mid-IR spectroscopy in the pharmaceutical process environment. **Spectroscopy**. v.19, n. 2, p. 60-63, 2004.

ELLOUZE, F., AMAR, N. B., DERATANI, E. Les cyclodextrines a large cycle: synthèse, purification, et applications. **Comptes Rendus Chimie**, v.14(10), p. 967-971, 2011.

ELSEBAI, M.F.; KEHRAUS, S.; KÖNIG, G.M. Caught between triterpene and steroid metabolism: 4a-Carboxylic pregnane derivative from the marine alga-derived fungus *Phaeosphaeria spartinae*. **Steroids**. v.78, p.880–883, 2013.

FANG, Z.; COMINO, P.R.; BHANDAR, B. Effect of encapsulation of D-limonene on the moisture adsorption property of β -cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**. v.51, p.164-169, 2013.

FENG, L.; CHEN, C.; LI, T.; WANG, M.; TAO, J.; ZHAO, D.; SHENG, L. Flowery odor formation revealed by differential expression of monoterpene biosynthetic genes and monoterpene accumulation in rose (*Rosa rugosa* Thunb.). **Plant Physiology and Biochemistry**. v.75, p.80-88, 2014.

FELIX, F.S.; CIDES, L.C.S.; ANGNES, L.; MATOS, J.R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of Salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.95, n.3, p.877-880, 2009.

FERNANDES, L.P.; OLIVEIRA, W.P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I. M.; NOVÁK, C. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia Sidoides* essential oil obtained by *spray drying*. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.95, p.855–863, 2009.

FINK, J.K. Terpene Resins. **Reactive polymers fundamentals and applications: a concise guide to industrial polymers (Second Edition)**. William Andrew Publishing, p.303-315, 2013.

FREITAS, M.R.; ROLIM, L.A.; SOARES, M.F.L.R.; ROLIM-NETO, P.J.; ALBUQUERQUE, M.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**. v.89, n. 4, p.1095-1100, 2012.

GAINESVILLE, F.L., HyperChem, Version 8.0; Hybercube Inc.: USA, 2009.

GAO, H.; XU, L.; CAO, Y.; MA, J.; JIA, L. Effects of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and β -cyclodextrin on the distribution and biodegradation of phenanthrene in NAPL-water system. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.83, p.105-111, 2013.

GARCÍA, A.Á.; CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**. v.2, p.119-145, 2009.

GARNERO, C.; CHATTAH, A.K.; LONGHI, M. Improving furosemide polymorphs properties through supramolecular complexes of β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.95, p.139–145, 2014.

GAVINI E.; SPADA G.; RASSU G.; CERRI G.; BRUNDU A.; COSSU M.; SORRENTI M.; GIUNCHEDI P. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β -cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.63, p.472-82, 2011.

GE, X.; HUANG, Z.; TIAN, S.; HUANG, Y.; ZENG, C. Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity. **Carbohydrate Polymers**. v.89, p.208–212, 2012.

GIDWANI, B.; VYAS, A. Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.114, p.130–137, 2014.

GOUNARIS, Y. Biotechnology for the production os essential oils, flavours and volatile isolates. A review. **Flavour Fragrance Journal**. v.25, p.367-386, 2010.

GRAEBIN, C.S.; MADEIRA, M.F.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; MIGUEL, D.C.; ULIANA, S.R.B.; BENITEZ, D.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ROSA, R.G.; EIFLER-LIMA, V.L.. Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against Leishmania and Trypanosoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.45, p.1524–1528, 2010.

GRANDELLI, H.E.; HASSLER, J.C.; WHITTINGTON, A.; KIRAN, E. Melting point depression of Piroxicam in carbon dioxide + co-solvent mixtures and inclusion complex formation with β -cyclodextrin. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.71, p.19–25, 2012.

GRAUSGRUBER-GRÖGER, S.; SCHMIDERER, C.; STEINBORN, R.; NOVAK, J. Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). **Journal of Plant Physiology**. v.169, p.353–359, 2012.

GUTIERREZ, J.A.; CHAN, R.; BATT, T.S.; ADAMS, P.D.; KEASLING, J.D.; PETZOLD, C.J.; LEE, T.S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. **Metabolic Engineering**. v.19, p.33–41, 2013.

HÄDÄRUGÄ N.G. *Ficaria verna* Huds. extracts and their β -cyclodextrin supramolecular systems. **Chemistry Central Journal**. v.6, p.16, 2012.

HAIDONG, L.; FANG, Y.; ZHIHONG, T.; CHANGLE, R. Study on preparation of β -cyclodextrin encapsulation tea extract. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.49, p.561–566, 2011.

HAIYEE, Z.A.; SAIM, N.; SAID, M.; ILLIAS, R.M.D.; MUSTAPHA, W.A.W.; HASSAN, O. Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin. **Food Chemistry**. v.114, p.459–465, 2009.

HAMPELE I.C.; D'ARCY A.; DALE G.E.; KOSTREWA D.; NIELSEN J.; OEFNER C.; PAGE M.G.P.; SCHÖNFELD H-J.; STÜBER D.; THEN R.L. Structure and Function of the Dihydropteroyl Synthase from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**. v.268, p.21-30, 1997.

HARATA, K. Structural Aspects of Stereodifferentiation in the Solid State. **Chemical Reviews**. v.98, p.1803-1827, 1998.

HARTWIG, S.; FRISTER, T.; ALEMDAR, S.; LI, Z.; KRINGS, U.; BERGER, R.G.; SCHEPER, T.; BEUTEL, S. Expression, purification and activity assay of apatchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. v.97, p.61-71, 2014.

HEDGS A.R. Industrial applicatons of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. v.98, p. 2035-2044, 1998.

HUANG, S.Y. Search strategies and evaluation in protein–protein docking: principles, advances and challenges. **Drug Discov Today** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.005>.

HUANG, Y. CHENG, Y.; ALEXANDER, K.; DOLLIMORE, D. The thermal analysis study of drug captopril. **Thermochimica Acta**. v.367, p.43-58, 2001.

HUI, W.; XIAOXIA, X.; FENGYI, Z.; QIAN, Z.; QING, T.; YINA, Z.; CHENG, C.; CHENGLIANG, Z.; SHUQIN, Y. Evaluation of cholesterol depletion as a marker of nephrotoxicity in vitro for novel β -cyclodextrin derivatives. **Food and Chemical Toxicology**. v.49, p.1387–1393, 2011.

JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. CDs as solubilizers: Effects of excipients and competing drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v.379, p.32–40, 2009.

JAYARAMAN, R.; SHIVAKUMAR, A.; ANITHA, T.; JOSHI, V.D.; PALEI, N.N. Antidiabetic effect of petroleum ether extract of *Citrullus colocynthis* fruits against Streptozotocin-induced hyperglycemic rats. **Romanian journal of biology - plant biology**. v.54, p.127–34, 2009.

JING, L.; ZHANG, Y.; FAN, S.; GU, M.; GUAN, Y.; LU, X.; HUANG, C.; ZHOU, Z. Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. **European Journal of Pharmacology**. v.715, p.46–55, 2013.

KALOGEROPOULOS, N.; YANNAKOPOULOU, K.; GIOXARI, A.; CHIOU, A.; MAKRIS, D.P. Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. **LWT - Food Science and Technology**. v.43, p.882–889, 2010.

KAYACI, F.; AYTAC, Z.; UYAR, T. Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**. v.261, p.286–294, 2013.

KIYOTA, H.; OKUDA, Y.; ITO, M.; HIRAI, M.Y.; IKEUCHI, M. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂. **Journal of Biotechnology**. v.185, p.1–7, 2014.

KLEINE, S.; MÜLLER, C. Differences in shoot and root terpenoid profiles and plant responses to fertilisation in *Tanacetum vulgare*. **Phytochemistry**. v.96, p.123–131, 2013.

KRANAWETVOGL, A.; SCHÜLER, J.; MÜLLER, S.; THIERMANN, H.; WOREK, F.; REITER, G. Elimination pathways of cyclosarin (GF) mediated by β -cyclodextrin in vitro: Pharmacokinetic and toxicokinetic aspects. **Toxicology Letters**. v.222, p.164–170, 2013.

KUMAR, P.M.; SASMAL D.; MAZUMDER P.M. The antihyperglycemic effect of aerial parts of *Salvia splendens* (scarlet sage) in streptozotocin-induced diabetic-rats. **Pharmacognosy Research**. v.2, p.190–194, 2010.

KUMBASAR, E.P.A.; AKDUMAN, Ç.; ÇAY, A. Effects of β -cyclodextrin on selected properties of electrospun thermoplastic polyurethane nanofibres. **Carbohydrate Polymers**. v.104, p.42–49, 2014.

KUPSKA, M.; CHMIEL, T.; JEDRKIEWICZ, R.; WARDENCKI, W.; NAMIESNIK, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries. **Food Chemistry**. v.152, p.88–93, 2014.

KURDELAS, R.R.; LÓPEZ, S.; LIMA, B.; FERESIN, G.E.; ZYGADLO, J.; ZACCHINO, S.; LÓPEZ, M.L.; TAPIA, A.; FREILE, M.L. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. **Industrial Crops and Products**. v.40, p.261– 267, 2012.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. Review. **International Journal of Pharmaceutics**. v.453, p.167–180, 2013.

LAPPAS, C.M.; LAPPAS, N.T. D-Limonene modulates T lymphocyte activity and viability. **Cellular Immunology**. v.279, p.30–41, 2012.

LATOWSKI, D.; SZYMANSKA, R.; STRZAŁKA, K. Chapter 9 – Carotenoids Involved in Antioxidant System of Chloroplasts.. In: Parvaiz Ahmad. **Oxidative Damage to Plants**. Antioxidant Networks and Signaling. 1ª edição. Editora: Elsevier. p.289–319, 2014.

LE, H.T.; JEON, H.M.; LIM, C.W.; KIM, T.W. 6-Triazolyl-6-deoxy- β -cyclodextrin derivatives: Synthesis, cellular toxicity, and phase-solubility study, **Carbohydrate Research**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.03.020>. 2014.

LEACH, A.R. Molecular Modeling: Principles and Applications; Prentice Hall: London, UK, 2001.

LENNARTSSON, P.R.; YLITERVO, P.; LARSSON, C.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Growth tolerance of Zygomycetes *Mucor indicus* in orange peel hydrolysate without detoxification. **Process Biochemistry**. v.47, p.836–842, 2012.

LEONTI, M. The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v.134, p. 542–555, 2011.

LI, S.; XING, P.; ZHANG, L.; XIN, F.; NIE, J.; WANG, H.; MA, M.; WU, Y.; HAO, A. Controllable self-assembly of an amphiphilic drug with β -cyclodextrin and α -amylase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.445, p.67–74, 2014.

LI, P.H.; CHIANG, B.H. Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.19, p.192–197, 2012.

LICHTENTHALER, H.K. 2 - Biosynthesis and Emission of Isoprene, Methylbutanol and Other Volatile Plant Isoprenoids. **The Chemistry and Biology of Volatiles**. Edited by Andreas Herrmann. p.11-40, 2010.

LIMA, N.G.P.B.; SOUSA, D.P.; PIMENTA, F.C.F.; ALVES, M.F.; SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; CARDOSO, R.B.; MORAIS, L.C.S.L.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.103, p.450–454, 2013.

LIN, H.L.; LIN, S.Y.; LIN, C.C.; HSU, C.H.; WU, T.K.; HUANG, Y.T. Mechanical grinding effect on thermodynamics and inclusion efficiency of loratadine–cyclodextrin inclusion complex formation. **Carbohydrate Polymers**. v.87, p.512–517, 2012.

LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Interação Molecular entre Alfa-Ciclodextrina e Triptofano. **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 11, p. 11-14, 2008.

LOFTSSON, T. & BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 62, p. 1607–1621, 2010.

LOHR, M.; SCHWENDER, J.; POLLE, J.E.W. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae. **Plant Science**. v.185–186, p.9–22, 2012.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**. v.27, p.670-673, 2004.

LU, W.C.; CHIANG, B.H.; HUANG, D.W.; LI, P.H. Skin permeation of D-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.21, p.826–832, 2014.

LÜDDEKE, F.; WÜLFING, A.; TIMKE, M.; GERMER, F.; WEBER, J.; DIKFIDAN, A.; RAHNFIELD, T.; LINDER, D.; MEYERDIERKS, A.; HARDERA, J. Geraniol and Geranial Dehydrogenases Induced in Anaerobic Monoterpene Degradation by *Castellaniella defragrans*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.78, p. p. 2128–2136, 2012.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES SOBRINHO, J.L.; ROLIM NETO P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.117-124, 2010.

MACEDO, O.F.L. Preparação e Caracterização de complexos de inclusão entre 2-trimetoprim e 2-hidroxipropil-gamaciclodextrina. **[Tese de mestrado]** São Cristovão-SE. 2010.

MADRONICH, M.B.; GREENBERG, J.P.; WESSMAN, C.A.; GUENTHER, A.B. Monoterpene emissions from an understory species, *Pteridium aquilinum*. **Atmospheric Environment**. v.54, p.308-312, 2012.

MANAKKER, F.; VERMONDEN, T.; VANS NOSTRUM, C. F.; HENNINK, W. E.; VAN DEMANAKKER, F. Cyclodextrin-based polymeric materials: Synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. **Biomacromolecules**. v.10, p.3157–3174, 2009.

MARIENHAGEN, J. & BOTT, M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. **Journal of Biotechnology**. v.163, p.166–178, 2013.

MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**. v.25, p.313–326, 2010.

MARRETO R.N.; ALMEIDA, E.E.C.V.; ALVES, P.B.; NICULAU, E.S.; NUNES, R.S.; MATOS, C.R.S.; ARAÚJO, A.A.S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**. v.475, p.53–58, 2008.

MARTIN DEL VALLE, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**. v.39, p.1033–1046, 2004.

MARTÍN, Á.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M. J. Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils. **The Open Chemical Engineering Journal**. v.4, p.31–41, 2010.

MATSUNAGA, S.N.; CHATANI, S.; NAKATSUKA, S.; KUSUMOTO, D.; KUBOTA, K.; UTSUMI, Y.; ENOKI, T.; TANI, A.; HIURA, T. Determination and potential importance of diterpene (kaur-16-ene) emitted from dominant coniferous trees in Japan. **Chemosphere**. v.87, p.886–893, 2012.

MAY, B.; LANGE, B.M.; WÜST, M. Biosynthesis of sesquiterpenes in grape berry exocarp of *Vitis vinifera* L.: Evidence for a transport of farnesyl diphosphate precursors from plastids to the cytosol. **Phytochemistry**. v.95, p.135–144, 2013.

MCCORMICK, A.C.; UNSICKER, S.B.; GERSHENZON, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. Special Issue: Specificity of plant–enemy interactions. **Trends in Plant Science**. v.17, No.5, p.303–310, 2012.

MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; SILVA, G.F.; OLIVEIRA, J.F.; CARVALHO, F.M.S.; SOUZA, J.C.C.; MATOS, J.R.; ALVES, P.B.; MATOS, I.L.; HADARUGA, D.I.; ARAÚJO, A.A.S. Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.115, p.2429–2437, 2014.

MENICHINI, F.; LOIZZO, M.R.; BONESI, M.; CONFORTI, F.; DE LUCA, D.; STATI, G.A.; DE CINDIO, B.; MENICHINI, F.; TUNDIS, R. Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. **Food and Chemical Toxicology**. v.49, p.1549–1555, 2011.

MENNINI, N.; BRAGAGNI, M.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Physico-chemical characterization in solution and in the solid state of clonazepam complexes with native and chemically-modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.89, p.142–149, 2014.

MIRO, A.; QUAGLIA, F.; CALIGNANO, A.; BARBATO, F.; CAPPELLO, B.; LA ROTONDA, M.I. Physico-chemical and pharmacological proprieties of Nimesulide/ β -cyclodextrin formulations. **STP Pharma Sciences**. v.10, p. 157-164, 2000.

MOLEGRO, available at <http://www.clcbio.com/products/molegro/#molecular-viewer> access in 8/14/2013.

MOREIRA, C.P.S.; OLIVEIRA, D.M.; SANTOS, C.N.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A. Platypodiol a novel clerodane diterpene from *Baccharis platypoda*. **Tetrahedron Letters** (2014), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.07.021>.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022>. 2014.

MURALI, R.; SARAVANAN, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition** 2. v.2, p. 269–275, 2012.

NAGEGOWDA, D.A. Review: Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Letters**. v.584, p.2965–2973, 2010.

NAOUMKINA, M.A.; MODOLO, L.V.; HUHMAN, D.V.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; TANG, Y.; SUMNER, L.W.; DIXON, R.A. Genomic and Coexpression Analyses Predict Multiple Genes Involved in Triterpene Saponin Biosynthesis in *Medicago truncatula*^{[C][W]}. **The Plant Cell**. v.22, p.850–866, 2010.

NGUYEN, T.A.; LIU, B.; ZHAO, J.; THOMAS, D.S.; HOOK, J.M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food Chemistry**. v.136, p.186–192, 2013.

NIKFAR, S.; BEHBOUDI, A.F. Limonene. In Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), edited by Philip Wexler, **Academic Press**, Oxford, p.78-82, 2014.

NIU H., ZHAO L., LU M., ZHANG S., SUN J. The Ratio and Concentration of Two Monoterpenes Mediate Fecundity of the Pinewood Nematode and Growth of Its Associated Fungi. **PLoS ONE**. v.7, p.1-7, 2012.

OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V.; NANJUNDASWAMY, A.; BANSAL, S.; SINGH, S.; KAUR, S.; BABBAR, N. Enhanced ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. **Bioresource Technology**. v.102, p.1593–1601, 2011.

OGAWA, N.; KAGA, M.; ENDO, T.; NAGASE, H.; FURUISHI, T.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y.; UEDA, H. Quetiapine Free Base Complexed with Cyclodextrins to Improve Solubility for Parenteral Use. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.61, p.809–815, 2013.

OLIVEIRA, G.G.G.; FERRAZ, H.G.; MATOS, J.R. Thermoanalytical study of Glibenclamida and excipient. **Journal of Thermal s. Analysis and Calorimetry**. v.79, p.267-270, 2005.

OZAWA, T. Thermal analysis: review and prospect. **Thermochimica Acta**. v.355, p.35-42, 2000.

OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**. v.38, n.11, p.1881-1886, 1965.

OZAWA, T. Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis**. v. 2, p.301-324, 1970.

PADUKKA, I.; BHANDARI, B.; D'ARCY, B. Evaluation of Various Extraction Methods of Encapsulated Oil from *b*-Cyclodextrin-Lemon Oil Complex Powder. **Journal of food composition and analysis**. v.13, p.59-70, 2000.

PANDIT, V.; GORANTLA, R., DEVI, K., PAI, R.S.; SARASIJA, S. Preparation and Characterization of Pioglitazone Cyclodextrin Inclusion Complexes. **Journal of young pharmacists**. v.3, p. 267–274, 2011.

PARK, M.J.; GWAK, K.S.; YANG, I.; KIM, K.W.; JEUNG, E.B.; CHANG, J.W.; CHOI, I.G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**. v.80, p.290–296, 2009.

PEREIRA LOPES, J.E.F. WO/2011/120114 (A1) - Pharmaceutical formulation based on pure emu oil or on emu oil associated with innumerable other elements, carried by or complexed with micro-particles or nano-particles. Google Patentes. 2011.

PERTUIT, D.; AVUNDUK, S.; MITAINE-OFFER, A.C.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, C.; PAULULAT, T.; DELEMASURE, S.; DUTARTRE, P.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.

Triterpenoid saponins from the roots of two *Gypsophila* species. **Phytochemistry**. v.102, p.182–188, 2014.

PESCITELLI, G.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M.; C.; VINCIERI, F. F.; DI BARI, L. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 52, p. 479-483, 2010.

PETRALITO, S.; ZANARDI, I.; SPERA, R.; MEMOLI, A.; TRAVAGLI, V. Spectroscopic characterization of both aqueous and solid-state diacerhein/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.127, p.355–360, 2014.

PETROVIC, G.M.; STOJANOVIC, G.S.; RADULOVIC, N.S. Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, p.1382-1390, 2010.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**. v.101, p.121–135, 2014.

PUTIGNANI, L.; MASSA, O.; ALISI, A. Engineered *Escherichia coli* as new source of flavonoids and terpenóides. Review. **Food Research International**. v.54, p.1084–1095, 2013.

RACHWALIK, R.; HUNGER, M.; SULIKOWSKI, B. Transformations of monoterpene hydrocarbons on ferrierite type zeolites. **Applied Catalysis A: General**. v.427–428, p.98–105, 2012.

RAJENDIRAN, N.; MOHANDOSS, T.; VENKATESH, G. Investigation of inclusion complexes of sulfamerazine with α and β -cyclodextrins: An experimental and theoretical study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.124, p.441–450, 2014.

RAJENDIRAN, N.; MOHANDASS, T.; THULASIDHASAN, J. Investigation of α and β -cyclodextrin inclusion complexes with mefenamic acid and aceclofenac drugs: Spectral and theoretical study. **Journal of Molecular Liquids**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2013.11.027>, 2014 (1).

RAJENDIRAN, N.; THULASIDHASAN, J.; SARAVANAN, J. Inclusion complexation of isoprenaline and methyl dopa with α and β -cyclodextrin nanocavities: Spectral and theoretical study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.122, p.411–421, 2014 (2).

RAJENDIRAN, N.; SIVA, S.; SARAVANAN, J. Inclusion complexation of sulfapyridine with α and β -cyclodextrins: Spectral and molecular modeling study. **Journal of Molecular Structure**. v.1054–1055, p.215–222, 2013.

RAMOS, C.A.F. Avaliação histopatológica e bioquímica da injúria hepática experimental induzida pelo tratamento crônico de ratos com D-Limoneno. João Pessoa – UFPB/CCS, Dissertação Mestrado, 2010.

RAOOV, M.; MOHAMAD, S.; ABAS, M.R. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin Functionalized Ionic Liquid Polymer as a Macroporous Material for the Removal of Phenols and As(V). **International Journal of Molecular Sciences**. v.15, p.100-119, 2014.

RIEKES, M.K.; TAGLIARI, M.P.; GRANADA, A.; KUMINEK, G.; SILVA, M.A.S.; STULZER, H.K. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. **Materials Science and Engineering: C**. v.30, p.1008–1013, 2010.

ROCHA, B.A.; RODRIGUES, M.R.; BUENO, P.C.P.; COSTA-MACHADO, A.R.M.; VAZ, M.M.O.L.L.; NASCIMENTO, A.P.; BARUD, H.S.; BERRETTA-SILVA, A.A. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin Increased water solubility of the chemical

constituents and antioxidant activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.108, p.87–94, 2012.

SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S.A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.98, p.89–93, 2010.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene - Mini-review. **Cancer Letters**. v.285, p.109–115, 2009.

SAMBASEVAM, K.P.; MOHAMAD, S.; SARIH, N.M.; ISMAIL, N.A. Synthesis and Characterization of the Inclusion Complex of β -cyclodextrin and Azomethine. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 3671-3682, 2013.

SANGPHEAK, W.; KHUNTAWE, W.; WOLSCHANN, P.; PONGSAWASDI, P.; RUNGROTMONGKOL, T. Enhanced stability of a naringenin/2,6-dimethyl β -cyclodextrin inclusion complex: Molecular dynamics and free energy calculations based on MM- and QM-PBSA/GBSA. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. v.50, p.10–15, 2014.

SANTIAGO, V.A.; JAYACHITRA, J.; SHENBAGAM, J.; NALINI, N.; M. Dietary D-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. **European Journal of Nutrition**. v.51, p.57–68, 2012.

SANTOS, P.R.P.; CARVALHO, R.B.F.; JÚNIOR, J.S.C.; FREITAS, R.M.; FEITOSA, C.M. Survey of physicochemical and pharmacological properties of extracts and compounds isolated from *Platonia insignis* Mart. a perspective for developing phytomedicines. **Brazilian Journal of Pharmacy**. v.94, p.161-168, 2013.

SANTOS, C.; BUERA, M.P.; MAZZOBRE, M.F. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. **Food Chemistry**. v.132, p.2030–2036, 2012.

SANTOS, S.R.L.; MELO, M.A.; CARDOSO, A.V.; SANTOS, R.L.C.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**. v.84, p.150–153, 2011.

SCHMIDERER, C.; GRAUSGRUBER-GROGER, S.; GRASSI, P.; STEINBORN, R.; NOVAK, J. Influence of gibberellin and daminozide on the expression of terpene synthases and on monoterpenes in common sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Plant Physiology**. v.167, p.779–786, 2010.

SCHURIG, V. Use of derivatized cyclodextrins as chiral selectors for the separation of enantiomers by gas chromatography. General review. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v.68, p.82–98, 2010.

SEKHON, B.S. Supercritical Fluid Technology: An Overview of Pharmaceutical Applications. **International Journal of PharmTech Research**. v.2, p. 810-826, 2010.

SENATORE, F.; OLIVIERO, F.; SCANDOLERA, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; ROSCIGNO, G.; ZACCARDELLI, M.; FALCO, E. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell]. **Fitoterapia**. v.90, p.214–219, 2013.

SERIDI, L.; BOUFELFE, A. Simulations of docking C60 in β -Cyclodextrin. **Journal of Molecular Liquids**. v.162, p.69–77, 2011.

SHENA, H.; WUB, G.; WANG, P. Intra-molecular enantiomerism in R-(+)-Limonene as evidenced by the differential bond polarizabilities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.128, p.838–843, 2014.

SHU, G. Use of volatile oil from plants in preparing medicaments for preventing and treating diabetes. Google Patents. 2010.

SIDDIQUE, H.R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies – Minireview. **Life Sciences**. v.88, p.285–293, 2011.

SIMON R.; GOMEZ RUIZ, J.A.; VON, H.C.; WENZL, T.; ANKLAM, E. Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.391, p.1397–1408, 2008.

SIVA, S.; THULASIDHASAN, J.; RAJENDIRAN, N. Host–guest inclusion complex of propafenone hydrochloride with α and β -cyclodextrins: Spectral and molecular modeling studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.115, p.559–567, 2013.

SONGKRO, S.; HAYOOK, N.; JAISAWANG, J., MANEENUAN, D.; CHUCHOME, T.; KAEWNOPPARAT, N. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with β -cyclodextrin for mosquito repellent. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. v.72, p.339-355, 2012.

SOUSA, F.B. Estudo e Caracterização Físico-Química de Sistemas Supramoleculares Nanoagregados e de Matrizes Poliméricas Associadas à Ciclodextrina. 126f. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química. 2010.

SOUZA, D.S.R.A.; DARIO, S.M.R.; PASSOS, J.J. Process for preparing inclusion compounds enclosing cyclodextrins and drugs, using a continuous-flow system. <http://www.google.com/patents/WO2013155586A1?cl=en&hl=pt-BR>. 2013.

SOUZA, M.A.F. Avaliação Termoanalítica e Cinética de Medicamentos Antiretrovirais (Estavudina, Lamivudina, Zidovudina) e síntese de novos produtos derivados dos antiretrovirais. 143p. **Tese de doutorado**. João Pessoa-PB. Departamento de química. 2008.

SRINIVASAN, K.; KAYALVIZHI, K.; SIVAKUMAR, K.; STALIN, T. Study of inclusion complex of β -cyclodextrin and diphenylamine: Photophysical and electrochemical behaviors. **Spectrochimica Acta Part A**. v.79, p.169–178, 2011.

SUTHARI, P.; KUMAR, H.P.; DODDI, S.; BANGA, P.R. Investigation of supramolecular stoichiometry and dynamic for inclusion complex of water soluble porphyrin with cucurbit[7]uril by fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.284, p.27–35, 2014.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**. v.98, p.1743-1754, 1998.

TAKAHASHI, A.I. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas. 99f. **Dissertação mestrado**. Área de Produção e controle farmacêutico. São Paulo, 2009.

TCHIMENE, M.K.; OKUNJI, C.O.; IWU, M.M.; KUETE, V. Monoterpenes and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa. **Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry**. p.1-32, 2013.

THOLL, D.; SOHRABI, R.; HUH, J.H.; LEE, S. The biochemistry of homoterpenes – Common constituents of floral and herbivore-induced plant volatile bouquets. **Phytochemistry**. v.72, p.1635–1646, 2011.

THORMAR, H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Iceland, Reykjavik, Iceland. **A John Wiley and Sons, Ltda Publication**. cap.9, p.205, 2011.

TSAI, Y.; TSAI, H.; WU, C.; TSAI, F. Preparation, characterization and activity of the inclusion complex of paenol with β -cyclodextrine. **Food Chemistry**. v. 120, p. 837-841, 2010.

TSUKUI, A.; SANTOS JÚNIOR, H.M.; OIGMAN, S.S.; DE SOUZA, R.O.M.A.; BIZZO, H.R.; REZENDE, C.M. Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. Review. **Food Chemistry**. v.164, p.266–271, 2014.

USMAN, L.A.; HAMID, A.A.; GEORGE, O.C.; AMEEN, O.M.; MUHAMMAD, N.O.; ZUBAIR, M.F. Chemical Composition of Rhizome Essential Oil of *Curcuma longa* L. Growing in North Central Nigeria. **World Journal of Chemistry**. v.4, p.178–181, 2009.

VALENTE, A.J.M.; SÖDERMAN, O. The formation of host–guest complexes between surfactants and cyclodextrins. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.205, p.156–176, 2014.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; RUIZ, K.; CHEMAT, F. Green procedure using limonene in the Dean–Stark apparatus for moisture determination in food products. **Analytica Chimica Acta**. v.674, p.49–52, 2010.

VENTURINI, C.G. Estudos do comportamento de corantes solvatocrômicos em soluções de ciclodextrinas. Tese Mestrado. Blumenau. 74p. 2005.

VIEIRA, C.G.; SANTOS, E.N.; GUSEVSKAYA, E.V.; Synthesis of fragrance compounds from acyclic monoterpenes: Rhodium catalyzed hydroformylation and tandem hydroformylation/acetalization of linalool and β -citronellene. **Applied Catalysis A: General**. v.466; p.208– 215, 2013.

WENG, A.; JENETT-SIEMS, K.; SCHMIEDER, P.; BACHRAN, D.; BACHRANC, C.; GÖRICK, C.; THAKUR, M.; FUCHS, H.; MELZIG, M.F. A convenient method for saponin isolation in tumour therapy - Short communication. **Journal of Chromatography B**. v.878, p.713–718, 2010.

WOLF, L.K. New software and Websites for the Chemical Enterprise. **Chemical & Engineering News**. v.87, p.31, 2009.

WU, L.; VOGT, F.G. A review of recent advances in mass spectrometric methods for gas-phase chiral analysis of pharmaceutical and biological compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.69, p.133–147, 2012.

XIONG, X., ZHAO, X., SONG, Z. Exploring host–guest interactions of sulfobutylether- β -cyclodextrin and phenolic acids by chemiluminescence and site-directed molecular docking. *Analytical Biochemistry* 460 (2014) 54–60.

YANG, C.Q.; WU, X.M.; RUAN, J.X.; HU, W.L.; MAO, Y.B.; CHEN, X.Y.; WANG, L.J. Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry*. v.96, p.46–56, 2013.

YANG, L.J.; MA, S.X.; ZHOU, S.Y.; CHEN, W.; YUAN, M.W.; YIN, Y.Q.; YANG, X.D. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with β -cyclodextrin or its derivative. *Carbohydrate Polymers*. v.98, p.861–869, 2013a.

YANG, L., LI, C., YUAN, T., TAN, T., ZHANG, L. Preparation of highly pure daidzin on oligo- β -cyclodextrin-Sepharose HP and investigation of chromatographic behavior of isoflavones by molecular docking. *Journal of Chromatography B*. v.879, p.1773–1780, 2011.

YAO, Y.; XIE, Y.; HONG, C.; LI, G.; SHEN, H.; JI, G. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization and evaluation. *Carbohydrate Polymers* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.006>.

YOSHIDA, M.I. Cinética e mecanismo de reações de decomposição térmica no estado sólido: influência de variações estruturais no ligante, sobre o parâmetro cinético. Belo Horizonte, 1993. 202p. **Tese de Doutorado** – Instituto de Ciências Exatas – Universidade Federal de Minas Gerais.

YUAN, C.; LU, Z.; JIN, Z. Characterization of an inclusion complex of ethyl benzoate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food Chemistry**. v.152, p.140–145, 2014.

YUN, J. Limonene inhibits methamphetamine-induced locomotor activity via regulation of 5-HT neuronal function and dopamine release. **Phytomedicine**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.12.004>.

ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications - Review. **International Journal of Pharmaceutics**. v.461, p.351–366, 2014.

ZHANG, Z.; VRIESEKOOOP, F.; YUAN, Q.; LIANG, H. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. **Food Chemistry**. v.150, p. 307-312, 2014.

ZHANG, J.; MA, P.X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.65, p.1215–1233, 2013.

ZHOU, C.; LI, Z.; WIBERLEY-BRADFORD, A.E.; WEISE, S.E.; SHARKEY, T.D. Isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate/isopentenyl diphosphate ratio measured with recombinant isopentenyl diphosphate isomerase and isoprene synthase. **Analytical Biochemistry**. v.440, p.130–136, 2013.

ZHU CHUN-YAN; AN LIN-NA; DANG YUN-JIE; HU CHUN-HUI. Physicochemical Properties and Gastric Mucosa Irritation of Cantharidin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex. **An LN et al. Chinese Herbal Medicines**. v.4, p.224-229, 2012.

ZORNIO, C.F. Preparação e caracterização do complexo de inclusão β -ciclodextrina /(Z)-jasmona e da fibra de algodão enxertada com β -ciclodextrina. 127p. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de pós graduação em química. Florianópolis-SC. 2013.

ZOU, C.; LIU, Y.; YAN, X.; QIN, Y.; WANG, M.; ZHOU, L. Synthesis of bridged b-cyclodextrinepolyethylene glycol and evaluation of its inhibition performance in oilfield wastewater. Materials Chemistry and Physics. p.1-7, 2014.

Trabalhos Realizados

9. TRABALHOS REALIZADOS

SANTOS, P.B.P.; MENEZES, P.P.; DÓRIA, G.A.A.; SANTANA, B.V.; SERAFINI, M.R.; PORTO NETO, A.N.; LIMA, C.M.; SANTOS, A.R.; QUINTANS-JUNIOR L.J.; ARAÚJO, A.A.S.; SILVA F.A. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão utilizando limoneno em α e β -ciclodextrinas. Apresentado em forma de painel no I Encontro de Farmácia do Centro Sul de Sergipe e I Simpósio de Farmácia realizados nos dias 20 e 21 de janeiro de 2014, em Lagarto/SE.

SANTOS, P.B.P.; MENEZES, P.P.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFINI, M.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARAÚJO, A.A.S.; CARVALHO, F.M.S.; MATOS, I.L.; ALVES, P.B. Influência da inclusão molecular do (E)-cariofileno em β -ciclodextrina. Apresentado em forma de painel no I Encontro de Farmácia do Centro Sul de Sergipe e I Simpósio de Farmácia realizados nos dias 20 e 21 de janeiro de 2014, em Lagarto/SE.

Title: Docking, chemical and physical properties of α - and β -Cyclodextrin Complex Containing Isopulegol - A comparative study.

Journal: Thermochemica Acta

Corresponding Author: Paula Menezes

Co-Authors: Grace Anne A Dória; Adriano Antunes S Araújo; Bruna Maria H Sousa; Polliana Barbosa P Santos; Lucindo J Quintans-Júnior; Rafaely N Lima; Péricles B Alves; Flávio Machado S Carvalho; Daniel P Bezerra; Francisco Jaime B Mendonça-Júnior; Luciana Scotti; Marcus T Scotti; Gabriel F Silva; Mairim R Serafini.

PAULA DOS PASSOS MENEZES, ISABELLA GONÇALVES MATOS, ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO, POLLIANA BARBOSA PEREIRA SANTOS, GRACE ANNE AZEVEDO DÓRIA, MÁRCIO ROBERTO VIANA DOS SANTOS, DANIEL PEREIRA BEZERRA, MAIRIM RUSSO SERAFINI. Caracterização físico-química do complexo de inclusão do (-)- β -pineno em β -ciclodextrina. Apresentado em forma de banner no participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (CBRATEC), realizado de 09 a 12 de novembro em Serra Negra - SP, Brasil.

BRUNA M. H. SOUSA, PAULA P. MENEZES, GRACE ANNE A. DÓRIA, MAIRIM R. SERAFINI, POLLIANA B. P. SANTOS, ANDERSON R. SANTOS, LUCINDO J. QUINTANS-JÚNIOR, RAFAELY NASCIMENTO LIMA, PÉRICLES BARRETO ALVES, FLÁVIO M. S. CARVALHO, DANIEL P. BEZERRA, FRANCISCO JAIME B. MENDONÇA JÚNIOR, LUCIANA SCOTTI, ADRIANO A. S. ARAÚJO. Estudo comparativo da complexação do isopulegol em α - e β -ciclodextrina. Apresentado em forma de banner no participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e

Calorimetria (CBRATEC), realizado de 09 a 12 de novembro em Serra Negra - SP, Brasil.

PAULA P. MENEZES, PÉLIGRIS H. SANTOS, LUCAS A. SÁ, GRACE KELLY M. ALMEIDA, JOSÉ M. MENDES NETO, JUCILENE F. SANTOS, RODRIGO M. SANTOS, SANDRA L. SANTOS, POLLIANA B. P. SANTOS, GRACE ANNE A. DÓRIA, FRANCIELLY O. ARAÚJO, GABRIEL F. SILVA, DANIEL P. BEZERRA, ADRIANO A. S. ARAÚJO, MAIRIM R. SERAFINI. Desenvolvimento e avaliação da atividade cardioprotetora do complexo de inclusão do ácido úsnico em β -ciclodextrina. Apresentado em forma de banner no participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (CBRATEC), realizado de 09 a 12 de novembro em Serra Negra - SP, Brasil.

TATIANNY A. ANDRADE, BRUNA M. H. SOUSA, IGOR A. S. TRINDADE, PAULA P. MENEZES, GRACE ANNE A. DÓRIA, BRUNO S. LIMA, FRANCILENE A. SILVA, POLLIANA B. P. SANTOS, LUCINDO J. QUINTANS-JÚNIOR, GABRIEL F. SILVA, DANIEL P. BEZERRA, MÁRCIO ROBERTO VIANA DOS SANTOS, MAIRIM R. SERAFINI, ADRIANO A. S. ARAÚJO. Inclusão molecular do (-)-borneol em β -ciclodextrina: preparação e caracterização físico-química. Apresentado em forma de banner no participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (CBRATEC), realizado de 09 a 12 de novembro em Serra Negra - SP, Brasil.

JOSÉ JÚLIO R. VIANA, PAULA S. NUNES, PAULA P. MENEZES, GRACE ANNE A. DÓRIA, MAIRIM R. SERAFINI, POLLIANA B. P. SANTOS, GABRIEL F. SILVA, OSVALDO FIGUEIREDO, ADRIANO ANTUNES S. ARAÚJO. Caracterização físico-química de bezoar obtido após ressecção de tumor retal. Apresentado em forma de banner no participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (CBRATEC), realizado de 09 a 12 de novembro em Serra Negra - SP, Brasil.

LUCIANA G. B. TEIXEIRA, PAULA S. NUNES, MARIA JOSELI M. JESUS, ANNY KELLY T. JESUS, BRUNA M. H. SOUZA, POLLIANA B. P. SANTOS, JOSÉ JOATAN R. JÚNIOR, MAIRIM R. SERAFINI, PAULA P. MENEZES, ADRIANO A. S. ARAÚJO. Desenvolvimento e caracterização físico-química de membranas de gelatina contendo ácido úsnico e nanopartículas de prata. Apresentado em forma de banner no participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (CBRATEC), realizado de 09 a 12 de novembro em Serra Negra - SP, Brasil.

POLLIANA B. P. SANTOS, PAULA P. MENEZES, GRACE ANNE A. DÓRIA, BRUNA M. H. SOUSA, MAIRIM R. SERAFINI, ANDERSON R. SANTOS, LUCIANA F. MENEZES, PAULA S. NUNES, LUCINDO J. QUINTANS-JÚNIOR, RAFAELY N. LIMA, PÉRICLES BARRETO ALVES, FLÁVIO M. S. CARVALHO, DANIEL P. BEZERRA, FRANCISCO JAIME B. MENDONÇA JÚNIOR, ADRIANO A. S. ARAÚJO. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão de

limoneno em α e β - ciclodextrinas. Apresentado em forma de banner no participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria (CBRATEC), realizado de 09 a 12 de novembro em Serra Negra - SP, Brasil.